

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de formulaciones de acción
antiparasitaria de extractos de *Artemisia***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Inés Pérez Román

DIRECTORES

Damián Córdoba Díaz
Juan José García Rodríguez
Manuel Córdoba Díaz

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO GALÉNICO DE FORMULACIONES
DE ACCIÓN ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS
DE ARTEMISIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Inés Pérez Román

Directores

**Damián Córdoba Díaz
Juan José García Rodríguez
Manuel Córdoba Díaz**

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. INÉS PÉREZ ROMAN,
estudiante en el Programa de Doctorado D9BI - DOCTORADO EN FARMACIA,
de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

DESARROLLO GALÉNICO DE FORMULACIONES DE ACCIÓN ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS DE ARTEMISIA

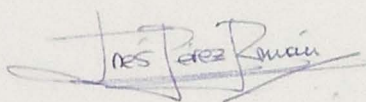
y dirigida por: MANUEL CÓRDOBA DÍAZ, JUAN JOSÉ GARCÍA RODRÍGUEZ Y
DAMIÁN CÓRDOBA DÍAZ

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 5 de SEPTIEMBRE de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, los profesores Dr. D. Manuel Córdoba Díaz y Dr. D. Damián Córdoba Díaz, por animarme a desarrollar mi actividad investigadora ya durante mis estudios de licenciatura en Farmacia, por sus consejos y sugerencias y por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en el Departamento de CC. Farmacéuticas de la Universidad de Amberes (Bélgica), que me permitió continuar mi trabajo de investigación, así como vivir nuevas y enriquecedoras experiencias personales.

Asimismo, quiero agradecer a mi también director, el profesor Dr. D. Juan José García Rodríguez, sus recomendaciones y su ayuda en la realización de los estudios en ratones y la publicación de resultados, que han sido decisivos para la elaboración de este trabajo, y el haberme facilitado, en colaboración con la Dra. Dña. Azucena González, al auténtico protagonista de esta tesis, un extracto de *Artemisia absinthium* obtenido por el Instituto de Ciencias Agrarias, perteneciente al Centro Superior de Investigaciones Científicas.

También quiero destacar la ayuda que he recibido del profesor Dr. D. Filip Kiekens, su acogida durante mi estancia en Bélgica y sus consejos, tanto en la elaboración de los experimentos como en la difusión de los resultados de esta tesis. Asimismo, quiero dar las gracias a todo su equipo de investigación, especialmente a Géraldine, Tim, Sofie, Arnout, Shari y Anna, por su buena acogida, disposición y ayuda en el laboratorio. Gracias a su buen humor y a nuestras “catas de restaurantes” cercanos al campus Drie Eiken, el trabajo en el laboratorio se hizo mucho más llevadero.

En estos agradecimientos, no puedo olvidar a la profesora Dra. Dña. Ana Isabel Olives y al profesor Dr. D. Juan Carlos Doadrio, del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, que me permitieron utilizar sus instalaciones para los estudios de análisis de partículas y conductividad; a la profesora Dra. Dña. María Gloria Molero Martín-Portugués, directora del Departamento de Microbiología y Parasitología y por supuesto, a la profesora Dra. Dña. Emilia María Barcia Hernández, directora del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros que me han ayudado en el día a día en esta Facultad, a Marina y Juan Luis, del antiguo Departamento de Química

Inorgánica y a Alicia, Vero, Sara y Dani del antiguo Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Finalmente, y no por ello menos importante, quiero dar las gracias a mis profesores de esta Facultad, mis compañeras en la empresa Weber, mis amigos y mi familia, por acompañarme en este largo camino. A todos, muchas gracias.



(Köhler et al., 1883)

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES FRUTO DE ESTA INVESTIGACIÓN:

Publicaciones:

- Perez-Roman I, Kiekens F, Cordoba-Diaz D, Garcia-Rodriguez JJ, y Cordoba-Diaz M. *Development of a tablet formulation based on a liquid-loaded silica carrier*. Drug Development and Industrial Pharmacy. (pendiente de aceptación)
- Perez-Roman I, Garcia-Rodriguez JJ, Kiekens F, Cordoba-Diaz D y Cordoba-Diaz M. *Enhanced nematocidal activity of a novel Artemisia extract formulated as a microemulsion*. Natural Product Communications, 1-6 (2019). DOI: 10.1177/1934578X19852435.
- Pérez Román I. *Desarrollo de sistemas sólidos para la administración oral de un extracto de Artemisia absinthium mediante un diseño de experimentos*. Libro de comunicaciones XI Jornada sobre Tecnología Farmacéutica, Biofarmacia y Farmacocinética. 2017. ISBN: 978-84-697-5290-6. Págs. 99-102.

Comunicaciones orales:

- Pérez Román I. *Desarrollo de sistemas sólidos para la administración oral de un extracto de Artemisia absinthium mediante un diseño de experimentos*. XI Jornada sobre Tecnología Farmacéutica, Biofarmacia y Farmacocinética. Madrid, España, 2017.
- Perez-Roman I. Kiekens F, Garcia-Rodriguez JJ, Cordoba-Diaz D y Cordoba-Diaz M. *Anthelmintic activity of an Artemisia absinthium extract formulated in oral solutions and emulsions*. 18th Forum of Pharmaceutical Sciences, organizado por la *Belgian Society of Pharmaceutical Sciences*. Blankenberge, Bélgica, 2015.

Comunicaciones en formato póster:

- Perez-Roman I. Kiekens F, Garcia-Rodriguez JJ, Cordoba-Diaz D y Cordoba-Diaz M. *Improvement of anthelmintic activity of an Artemisia absinthium extract based on a microemulsion formulation*. 11th PBP World Meeting. Granada, España, 2018.
- Perez-Roman I. Kiekens F, Garcia-Rodriguez JJ, Cordoba-Diaz, D y Cordoba-Diaz, M. *Optimization of surfactants in a microemulsion system for oral administration by design of experiments*. Formula VIII. Barcelona, España, 2016.
- Pérez Román I. García Rodríguez JJ, Córdoba Díaz M y Córdoba Díaz D. *Actividad nematocida de un aceite esencial de Artemisia sp formulado en emulsión*. IX Jornadas Complutenses, VIII Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para alumnos pregraduados y XVIII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas. Madrid, España, 2014.

OTROS MÉRITOS

- Estancia en el *Department of Pharmaceutical Sciences* de la Universidad de Amberes (Bélgica) desde el 15 de enero al 31 de mayo de 2015 (4,5 meses), bajo la supervisión del Prof. Dr. D. Filip Kiekens. Durante la estancia se llevaron a cabo las siguientes investigaciones:
 - Análisis de las propiedades reológicas de un extracto de *Artemisia absinthium* y sus formulaciones.
 - Desarrollo de formulaciones sólidas mediante la incorporación de un extracto de *A. absinthium* vehiculizado en una microemulsión a un material poroso de sílice. Análisis y caracterización.



Índice General

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. ENFERMEDADES PARASITARIAS: NEMATODOSIS INTESTINALES	12
1.1.1. Agente etiológico	12
1.1.1.1. Ciclo biológico	13
1.1.1.2. Morfología de los nematodos adultos.....	14
1.1.2. Modelo de nematodosis intestinal: <i>Trichinella spiralis</i>	20
1.1.2.1. Ciclo biológico de <i>T. spiralis</i>	20
1.1.2.2. Modelo murino de <i>T. spiralis</i> utilizado en investigación.	23
1.1.3. Tratamiento farmacológico de las nematodosis intestinales.	23
1.1.3.1. Bencimidazoles: albendazol.....	23
1.1.3.2. Exposición del parásito a albendazol.....	24
1.1.4. Resistencias al tratamiento antihelmíntico.	25
1.1.4.1. Mecanismos de resistencia en nematodos.....	25
1.1.4.2. Estrategias terapéuticas frente a las resistencias.	26
1.2. EL USO DE ARTEMISIA SPP. EN EL TRATAMIENTO DE LAS	28
NEMATODOSIS INTESTINALES.....	28
1.2.1. <i>Artemisia absinthium</i> en la Península Ibérica.	29
1.2.2. Nuevos cultivos de <i>Artemisia absinthium</i>.....	30
1.3. ESTRATEGIAS DE FORMULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES. ..	34
1.3.1. Formulación de aceites esenciales: microemulsiones.....	34
1.3.1.1. Definición de microemulsión.	34
1.3.1.2. Emulgentes	35
1.3.1.3. Teorías sobre la formación de microemulsiones.	42
1.3.1.4. Procedimientos de preparación de microemulsiones.....	45
1.3.1.5. Técnicas de caracterización de las microemulsiones.....	48
1.3.2. Las microemulsiones como formulaciones intermedias: métodos de	57
solidificación.....	57

1.3.2.1.	Dispersiones sólidas.....	58
1.3.2.2.	Caracterización de dispersión sólida amorfa.....	63
1.3.2.3.	Formulación de una dispersión sólida amorfa en comprimidos.....	66
1.3.2.4.	Caracterización de comprimidos: compactación y compresión.....	68
1.4.	TÉCNICAS ESTADÍSTICAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS: METODOLOGÍA SUPERFICIE-RESPUESTA.	71
1.4.1.	Definición	71
1.4.2.	Diseños de mezclas	71
1.4.2.1.	Definición del área experimental.....	72
1.4.3.	Modelización	74
1.4.3.1.	Diseño experimental.	74
1.4.3.2.	Modelo experimental.	76
1.4.3.3.	Análisis de las observaciones.	77
1.4.3.4.	Áreas experimentales irregulares.....	79
1.4.3.5.	Análisis de la utilidad del modelo mediante contraste de hipótesis. .	79
1.4.3.6.	Parámetros de ajuste del modelo estadístico.....	83
1.4.3.7.	Transformación de la variable respuesta.....	86
1.4.4.	Optimización modelo-dependiente.....	88
1.4.4.1.	Validación del modelo	89
2.	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	92
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	94
3.1.	MATERIALES	94
3.1.1.	Equipos de laboratorio	94
3.1.2.	Fases oleosas.....	95
3.1.3.	Emulgentes y coemulgentes	95
3.1.4.	Reactivos	95
3.1.5.	Otros materiales.....	95
3.1.6.	Experimentos <i>ex vivo</i>	96
3.1.6.1.	Animales de experimentación	96
3.1.6.2.	Parásito.....	96
3.1.6.3.	Fármacos	96
3.1.6.4.	Reactivos	96
3.1.6.5.	Equipos y aparatos utilizados en los experimentos <i>ex vivo</i>	97

3.2. MÉTODOS.....	98
3.2.1. Desarrollo de una microemulsión.....	98
3.2.1.1. Descripción de los emulgentes y coemulgentes.....	98
3.2.1.2. Microemulsiones formadas por aceite de oliva.....	101
3.2.1.3. Microemulsiones formadas por extracto de <i>A. absinthium</i>	103
3.2.1.4. Caracterización de una línea de dilución.	104
3.2.1.5. Optimización de una microemulsión del extracto de <i>A. absinthium</i> . 107	
3.2.2. Análisis de la actividad nematocida de una microemulsión del extracto de <i>A. absinthium</i>.....	112
3.2.2.1. Preparación del medio HBSS.....	112
3.2.2.2. Obtención de larvas L1.	112
3.2.2.3. Preparación del ensayo <i>ex vivo</i>	113
3.2.3. Desarrollo de una formulación en comprimidos.....	115
3.2.3.1. Inclusión de la microemulsión en un material de sílice.....	115
3.2.3.2. Análisis espectrofotométrico de la microemulsión cargada.....	115
3.2.3.4. Estudio de estabilidad.	116
3.2.3.5. Comparativa de las cinéticas de liberación de la microemulsión....	117
3.2.3.6. Estudio de las propiedades de flujo del material de sílice.	118
3.2.3.7. Selección del aglomerante, de su contenido y de la fuerza de compresión.....	119
3.2.3.8. Optimización de una formulación en comprimidos.	121
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125
4.1. DESARROLLO DE UNA MICROEMULSIÓN	125
4.1.1. Selección de emulgentes.....	125
4.1.1.1. Fase oleosa: aceite de oliva.....	125
4.1.1.2. Fase oleosa: extracto de <i>A. absinthium</i>	128
4.1.1.3. Comparativa y discusión.	133
4.1.2. Caracterización de una línea de dilución.....	135
4.1.2.1. Viscosidad	135
4.1.2.2. Conductividad	138
4.1.3. Desarrollo de una microemulsión del extracto de <i>A. absinthium</i>....	143
4.1.3.1. Resultados de conductividad.....	144
4.1.3.2. Resultados de tamaño de gotícula.....	148

4.1.3.3. Optimización de una microemulsión.....	153
4.1.3.4. Caracterización de la microemulsión optimizada del extracto de <i>A. absinthium</i>	154
4.1.4. Actividad antinematoda de una microemulsión del extracto de <i>A. absinthium</i>.	159
4.2. DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN EN COMPRIMIDOS.....	162
4.2.1. Inclusión de la microemulsión en un material de sílice.	162
4.2.2. Cinéticas de liberación de formulaciones líquidas a partir del material de sílice cargado.	163
4.2.3. Estabilidad y comparativa de las cinéticas de liberación de la microemulsión.....	167
4.2.3.1. Resultados a los 15 días de reposición.....	167
4.2.3.2. Resultados a los 90 días de reposición.....	169
4.2.3.3. Comparativa	171
4.2.4. Estudio de la compactabilidad y compresión del material de sílice cargado.....	173
4.2.4.1. Selección del aglomerante, del contenido en aglomerante y de la fuerza de compresión.	174
4.2.4. Caracterización de una formulación en comprimidos.....	176
4.2.4.1. Resultados de los experimentos: fuerza tensil.....	179
4.2.4.2. Resultados de los experimentos: tiempo de disgregación.....	183
4.2.4.3. Optimización de una formulación en comprimidos.	186
5. CONCLUSIONES.....	192
6. BIBLIOGRAFÍA.....	196
7. ANEXO.....	215
ÍNDICE DE TABLAS.....	234
ÍNDICE DE FIGURAS.....	238

ABREVIATURAS

A/O	Fase externa oleosa
<i>A. absinthium</i>	<i>Artemisia absinthium</i>
<i>A. brevifolia</i>	<i>Artemisia brevifolia</i>
<i>A. lumbricoides</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>A. marítima</i>	<i>Artemisia marítima</i>
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
<i>A. vestita</i>	<i>Artemisia vestita</i>
AAD	amino-acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ANOVA	Análisis de la varianza
BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutica
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CM	Cuadrados medios
CMC	Celulosa microcristalina
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
Der	Derecha
ED	Eficacia de disolución
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EER	Error estándar relativo
FF-TEM	Microscopio electrónico de transmisión de criofractura
FESEM	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HLB	Equilibrio hidrofilia-lipofilia
ICA	Instituto de Ciencias Agrarias
ISO	Organización Internacional de normalización
Izda	Izquierda
LD₅₀	Dosis letal 50
O/A	Fase externa acuosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEC	Parámetro de empaquetamiento crítico
PIC	Punto de inversión de la composición
PIE	Punto de inversión de la emulsión

PIT	Temperatura de inversión de fases
PRESS	Suma de los cuadrados de error de predicción
PVP	Polivinilpirrolidona
SANS	<i>Small angle neutron scattering</i>
SAXS	<i>Small angle x-ray scattering</i>
SC	Suma de cuadrados
SMEDDS	Sistema de dosificación auto-microemulsionable
<i>T. trichuria</i>	<i>Trichuris trichiura</i>
TMD	Tiempo medio de disolución
<i>Z. cassumunar</i>	<i>Zingiber cassumunar</i>

RESUMEN

RESUMEN

DESARROLLO GALÉNICO DE FORMULACIONES DE ACCIÓN ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS DE ARTEMISIA

Las nematodosis intestinales se encuentran entre las parasitosis más prevalentes, que afectan especialmente a la población infantil. Las últimas investigaciones indican que se están desarrollando resistencias frente a los antihelmínticos comúnmente utilizados, dando lugar a niveles de eficacia inferiores a los esperados. Los extractos naturales a base de plantas con propiedades antihelmínticas constituyen una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente para el control de estas nematodosis.

En los últimos años, algunas poblaciones de *Artemisia absinthium* han sido cultivadas experimentalmente por el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA), obteniendo extractos carentes de los compuestos tóxicos tujonas y con una prometedora actividad nematocida. Sin embargo, las características fisicoquímicas y farmacotécnicas del extracto requieren del desarrollo de formulaciones galénicas que mejoren la biodisponibilidad y el acceso de los componentes nematocidas a las estructuras internas del nematodo para llevar a cabo su mecanismo de acción.

Entre estas estrategias destaca el desarrollo de formulaciones lipídicas como las microemulsiones, formadas por una fase oleosa, una fase acuosa y emulgentes, con o sin la incorporación de un coemulgente. Dependiendo de la disposición molecular, las microemulsiones pueden presentar una fase externa acuosa (O/A), oleosa (A/O) o formar sistemas bicontinuos, en los que se identifican estructuras lamelares interpuestas entre ambas fases. Para facilitar su dosificación, estos sistemas se incluyen habitualmente en cápsulas o se incorporan a portadores porosos sólidos, como materiales de sílice, que permiten su posterior formulación en comprimidos.

El objetivo de la presente investigación consiste en el desarrollo de formulaciones del extracto SN1-2010 de *A. absinthium* que mejoren sus características farmacotécnicas, su biodisponibilidad y acción nematocida frente a parásitos intestinales. Dado que la producción de estos extractos naturales es por el momento limitada, se deben utilizar métodos estadísticos que permitan el análisis adecuado del extracto y el desarrollo de las nuevas formulaciones.

Los objetivos específicos de esta tesis consisten en el desarrollo, análisis y optimización de una microemulsión del extracto de *A. absinthium*, seguido del estudio de su actividad nematocida, utilizando un modelo murino *ex vivo* de *T. spiralis*. Para facilitar su dosificación, se pretende desarrollar, analizar y optimizar una formulación en comprimidos mediante la incorporación de la microemulsión del extracto de *A. absinthium* a un material de sílice y su posterior compresión.

La combinación formada por el emulgente Tween[®] 80 y el coemulgente propilenglicol en proporción 1,5:1 p/p constituye una mezcla adecuada para formular el extracto de *A. absinthium*. A partir de estos resultados, se desarrollaron 16 experimentos o combinaciones de los 3 componentes (agua, extracto de *A. absinthium* y Tween[®] 80:propilenglicol [1,5:1 p/p]) mediante un modelo cuadrático, y que fueron analizados en función de su conductividad y tamaño de gotícula. Los resultados de tamaño de gotícula, medidos como diámetro medio de Sauter, se utilizaron en la optimización. La microemulsión optimizada se compone de 66,40% p/p de Tween[®] 80 y propilenglicol (1,5:1 p/p); 29,35% p/p del extracto de *A. absinthium* y 4,25% p/p de agua. Los resultados del modelo experimental sugieren que el extracto de *A. absinthium* y el agua son los componentes más influyentes en el tamaño de gotícula. El diámetro medio de Sauter de la formulación optimizada estimado por el modelo fue 1,1836 nm (IC 95%: 0,71 – 1,99), similar a los resultados obtenidos experimentalmente.

Se estima que la formulación optimizada presenta una estructura bicontinua, en donde los compuestos que constituyen el extracto de *A. absinthium* se disponen en lamelas. Por tanto, no es posible identificar glóbulos de fase oleosa y los que se detectan son muy pequeños (0,87 nm). Sin embargo, el incremento del contenido de la fase acuosa provoca la ruptura de las estructuras lamelares dando lugar a gotículas de tamaños mayores, cercanos a 100 nm.

A pesar del carácter oleoso de la microemulsión optimizada, su dispersión en agua dio lugar a gotículas con un diámetro medio de Sauter cercano a 50 nm, lo que supone una mejora potencial de la biodisponibilidad del extracto de *A. absinthium* en el medio intestinal.

Posteriormente, se analizó la eficacia nematocida de la microemulsión optimizada en un modelo experimental *ex vivo*, utilizando larvas L1 de *T. spiralis*. La formulación

optimizada se diluyó hasta una concentración de 0,05 % v/v, para comparar su eficacia nematocida con una disolución del extracto de la misma concentración. La primera provocó una mayor reducción en el número de parásitos intestinales (95,72%) respecto de la disolución (86,51%, $p=0,0033$). Por tanto, el desarrollo de una microemulsión permitió incorporar una mayor concentración del extracto vegetal, facilitando su dosificación y eficacia en el medio intestinal.

La microemulsión optimizada se incorporó a un material de sílice poroso, que permitió su solidificación. Se realizó un estudio de velocidad de disolución para conocer la cinética de liberación de la microemulsión del material de sílice. Los resultados mostraron que la cesión sigue una cinética de orden 1, siendo la constante de liberación $0,2385 \text{ minutos}^{-1}$. Por tanto, la microemulsión se libera proporcionalmente a la cantidad que se encuentra en el interior poroso del material de sílice.

Utilizando nuevamente un diseño de mezclas D-optimal, se optimizó una formulación en comprimidos a partir del material de sílice cargado. Se diseñaron 16 combinaciones de cada uno de los 6 componentes (Syloid® XDP: microemulsión (1:1,5); celulosa microcristalina PH102; polivinilpirrolidona; croscarmelosa; Syloid® 244 FP y estearato magnésico), en base a un modelo lineal. Como cabría esperar, los resultados mostraron que la polivinilpirrolidona es el componente que más contribuye a la fuerza tensil, mientras que la croscarmelosa sódica reduce en mayor medida el tiempo de desintegración. Cada comprimido de la formulación optimizada contiene 29,83% p/p de microemulsión, que a su vez está formada por 29,35% p/p de extracto de *A. absinthium*.

Los diseños de mezclas constituyen un procedimiento alternativo prometedor para el diseño y desarrollo de formulaciones líquidas y sólidas, ya que permiten seleccionar de forma eficiente los excipientes más adecuados para la formulación de los principios activos, siendo especialmente útil para aquellos con escasa disponibilidad. Este procedimiento estadístico nos ha permitido desarrollar con éxito diversas formulaciones para la vehiculización del extracto, que supone una alternativa prometedora a los tratamientos antiparasitarios actuales.

ABSTRACT

ABSTRACT

GALENIC DEVELOPMENT OF ANTIPARASITIC FORMULATIONS BASED ON ARTEMISIA EXTRACTS.

INTRODUCTION

Intestinal nematodoses are among the most prevalent parasitosis, which especially affect the child population. The latest research indicates that resistance is developing against commonly used anthelmintics, leading to lower levels of efficacy than expected. Plant-based extracts with anthelmintic properties constitute a sustainable and environmentally friendly alternative for the control of these nematodoses.

In recent years, some populations of *Artemisia absinthium* have been experimentally cultivated by the Institute of Agricultural Sciences (ICA), obtaining extracts -lacking the toxic compounds called thujones- with a promising nematocidal activity. However, the physicochemical and pharmacotherapeutic characteristics of the extracts require the development of galenic formulations that improve the bioavailability and access of the nematocidal components of the extract to the internal structures of the nematode, in order to carry out their mechanism of action.

These strategies include the development of lipid formulations such as microemulsions, formed by an oil phase, an aqueous phase and surfactants, with or without a cosurfactant. Depending on the molecular arrangement, microemulsions may form 3 different microstructures: oil-in-water (O/W), water-in-oil (W/O) or bicontinuous systems, in which lamellar structures interposed between both phases are identified. To facilitate their dosing, microemulsions are usually included in capsules or incorporated into solid porous carriers, such as silica materials, which allow their subsequent formulation into tablets.

The objective of the present investigation consists in the development of formulations of the extract SN1-2010 of *A. absinthium* that improve its pharmacotherapeutic characteristics, its bioavailability and nematocidal action against intestinal parasites. Since the production of these extracts is limited, statistical methods should be used to properly analyse the extract and develop new formulations.

The specific objectives of this thesis are the development, analysis and optimization of a microemulsion of the extract of *A. absinthium*, followed by the study of its nematocidal activity, using an *ex vivo* murine model of *T. spiralis*. To facilitate its dosage, it is intended to develop, analyze and optimize a tablet formulation by incorporating the microemulsion of the extract of *A. absinthium* into a silica material and its subsequent compression.

The combination formed by the Tween[®] 80 and propylene glycol in a 1.5: 1 w/w ratio constitutes a suitable mixture to formulate the extract of *A. absinthium*. From these results, 16 experiments or combinations of the 3 components (water, extract of *A. absinthium* and Tween[®] 80: propylene glycol [1.5:1 p/p]) were developed using a quadratic model. Their conductivity and droplet size were analysed. The microemulsion was optimized based on the droplet size results, measured as Sauter mean diameter. The optimized microemulsion is composed of 66.40% w/w Tween[®] 80 and propylene glycol (1.5:1 w/w); 29.35% w/w of the extract of *A. absinthium* and 4.25% w/w of water. The results of the experimental model suggest that the *A. absinthium* extract and the aqueous phase are the most influential components in droplet size. The Sauter mean diameter of the optimized formulation estimated by the model was 1.1836 nm (95% CI: 0.71-1.99), similar to the results obtained experimentally.

It is estimated that the optimized formulation has a bicontinuous structure, where the compounds constituting the extract of *A. absinthium* are arranged in lamellae. Therefore, it is not possible to identify oily-phase globules and those detected are very small (0.87 nm). However, the increase in the content of the aqueous phase causes the lamellar structures to rupture resulting in droplets of larger sizes, close to 100 nm.

Despite the oily nature of the optimized microemulsion, its dispersion in water resulted in droplets with a Sauter mean diameter close to 50 nm, which represents a potential improvement in the bioavailability of the extract of *A. absinthium* in the intestine.

Subsequently, the optimized microemulsion nematocidal efficacy was analyzed in an *ex vivo* experimental model, using L1 larvae of *T. spiralis*. The optimized formulation was diluted to a concentration of 0.05% v/v, to compare its nematocidal efficacy with a solution of the extract with the same concentration. The former showed a greater

reduction in the number of intestinal parasites (95.72%) in comparison to the solution (86.51%, $p = 0.0033$). Therefore, the development of a microemulsion allowed to incorporate a higher concentration of the plant extract, facilitating its dosage and efficacy.

The optimized microemulsion was incorporated into a porous silica material, which allowed its solidification. A dissolution test was conducted to analyse the microemulsion release of the silica material. The results showed that the microemulsion is released following a kinetics of order 1, being the release constant $0.2385 \text{ minutes}^{-1}$. Therefore, the microemulsion is released proportionally to the amount inside the silica material.

A tablet formulation was optimized from the loaded silica material, using a D-optimal mixture design. 16 combinations of each of the 6 components were designed (Syloid[®] XDP: microemulsion (1:1.5); microcrystalline cellulose PH102; polyvinylpyrrolidone; croscarmellose; Syloid[®] 244 FP and magnesium stearate), based on a linear model. As expected, the results showed that polyvinylpyrrolidone is the component that contributes most to tensile strength, while croscarmellose sodium reduces disintegration time to a greater extent. Each tablet of the optimized formulation contains 29.83% w/w microemulsion, which in turn consists of 29.35% w/w extract of *A. absinthium*.

Mixture designs are a promising alternative procedure for the design and development of liquid and solid formulations, since they allow efficient selection of the most suitable excipients for the formulation of active ingredients, being especially useful for those with limited availability. This statistical procedure has allowed us to successfully develop various formulations for the vehiculization of the extract, which is a promising alternative to current antiparasitic treatments.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES PARASITARIAS: NEMATODOSIS INTESTINALES

Las enfermedades parasitarias constituyen uno de los problemas de salud más importantes en los países en desarrollo. Entre las infecciones más prevalentes se encuentran las producidas por nematodos intestinales, que afectan especialmente a la población infantil (Muller y Wakelin, 2002).

En 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) inició una estrategia para la prevención y control de las nematodosis intestinales en zonas endémicas. Debido a su transmisión por el agua y los alimentos contaminados con restos fecales, se desarrollaron planes de educación sanitaria e higiene, así como infraestructuras sanitarias. También se organizaron campañas periódicas de tratamientos antiparasitarios, con fármacos como albendazol y mebendazol, efectivos, económicos y fáciles de administrar por personal no sanitario (Moser et al., 2017; OMS, 2016).

Aunque la implantación de estas medidas ha reducido la prevalencia de las nematodosis intestinales en los últimos años (Lin et al., 2010; Macchioni et al., 2015; Mejia Torres et al., 2014; Strunz et al., 2014; Ziegelbauer et al., 2012), estas infecciones todavía siguen afectando a más de 1.500 millones de personas, lo que supone el 20% de la población mundial (OMS, 2016). La principal zona afectada es Asia, aunque otras zonas endémicas son América Latina, América Central y África (Pullan et al., 2014). Los nematodos intestinales más prevalentes son las especies *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, y las uncinarias *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* (de Silva et al., 2003).

1.1.1. Agente etiológico

Los nematodos constituyen uno de los grupos de animales más abundantes y diseminados (Bogitsh et al., 2013a; Muller y Wakelin, 2002). En el ser humano, los nematodos se han adaptado a diferentes hábitats, tales como el tejido subcutáneo y la sangre, aunque el principal de todos ellos es el medio intestinal (de Silva et al., 2003; Muller y Wakelin, 2002).

1.1.1.1. Ciclo biológico

Como consecuencia de la diversidad biológica de estos organismos, los géneros de vida parasitaria presentan ciclos biológicos variados y complejos, que pueden requerir varios hospedadores para su desarrollo. Sin embargo, todos ellos responden a una misma estructura, constituida por dos etapas principales (Figura 1.1) (Bogitsh et al., 2013a):

- Etapa parasitaria. Tiene lugar en el intestino del hospedador definitivo y permite la maduración de las larvas del parásito hasta alcanzar el estadio adulto, en el que se diferencian en machos y hembras. Tras la cópula, la hembra adulta produce miles de huevos, que son eliminados en las heces (Bethony et al., 2006).
- Etapa pre-parasitaria. Se produce en el medio externo o bien en un hospedador intermedio. Da lugar a la eclosión de los huevos y al desarrollo de las larvas hasta el estadio infectante (Lee, 2002).

Como se observa en la imagen, el ciclo de todos los nematodos se compone de un estadio de huevo, 4 estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) y un estado adulto, en el que todas las estructuras reproductoras son funcionales (Figura 1.1) (Lee, 2002).

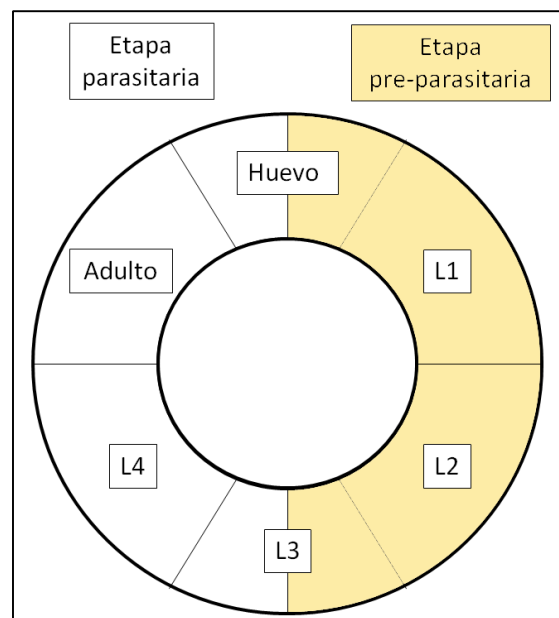


Figura 1.1. Esquema de las etapas principales del ciclo biológico de los nematodos. (Johnston *et al.* 2001).

1.1.1.2. Morfología de los nematodos adultos

Los nematodos se conocen popularmente como gusanos redondos, debido a su aspecto fusiforme. Su cuerpo es pseudocelomado, no segmentado, con longitudes que varían desde milímetros hasta varios metros (Bogitsh et al., 2013a; Lee, 2002). No tienen color, y varían desde traslúcidos (los más pequeños) a opacos (los mayores) cuando se examinan vivos. Es frecuente que algunos absorban materia coloreada de los tejidos adyacentes (Bogitsh et al., 2013a).

La estructura básica de los nematodos se compone de un tubo externo, con una cubierta superficial y músculos subyacentes, y un tubo interno, que constituye el tracto digestivo. Entre los tubos se encuentra el pseudoceluloma, que contiene el sistema reproductor, entre otras estructuras (Muller y Wakelin, 2002) (Figura 1.2).

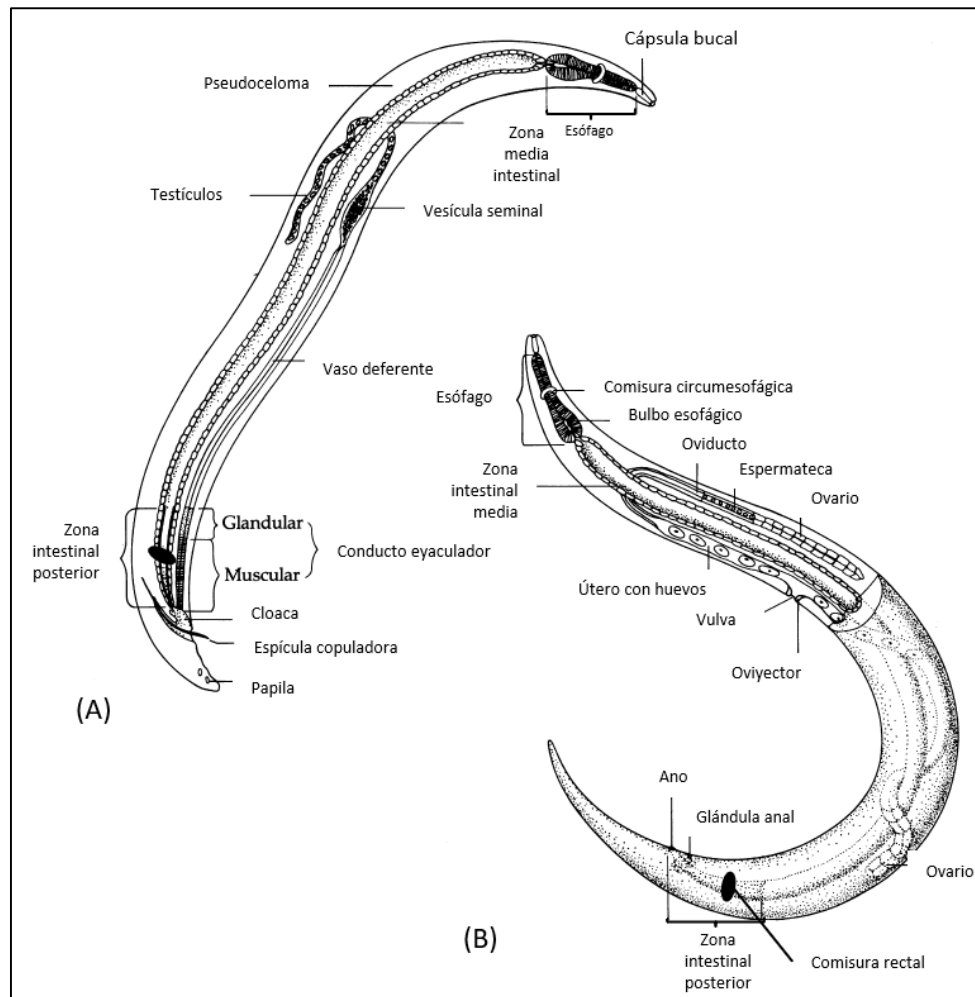


Figura 1.2. Morfología general de un nematodo adulto: macho (A) y hembra (B). (Bogitsh, Carter, y Oeltmann 2013a).

Las larvas de nematodos presentan una gran variedad biológica, por lo que su morfología es diferente según su especie y estado de desarrollo. Sin embargo, los nematodos que habitan en el medio intestinal durante el estadio adulto presentan estructuras comunes que se indican a continuación (Bogitsh et al., 2013a).

Cutícula

Se trata de una estructura compleja, que protege a los nematodos del medio, proporcionándoles un soporte estructural esencial para su esqueleto hidrostático (Sims et al., 1996; Thompson y Geary, 2003). La superficie de la cutícula es lisa, aunque puede contener estrías, espinas, crestas o papilas. Algunas de estas estructuras especializadas son sensoriales, y otras ayudan a la locomoción (Bogitsh et al., 2013a).

La cutícula cubre la superficie externa del nematodo, rodeando estructuras como la cavidad bucal, el esófago, el recto, la cloaca, la vagina y el poro excretor. La estructura de la cutícula presenta una gran diversidad; sin embargo, en los estadios adultos de las especies que parasitan a los vertebrados, la cutícula está formada generalmente por las siguientes capas (Bogitsh et al., 2013a; Thompson y Geary, 2003) (Figura 1.3):

- **Epicutícula.** Se trata de una capa relativamente fina y bastante consistente en todos los nematodos. Aunque no se conoce totalmente su función, se considera una barrera protectora. Está formada principalmente por carbohidratos, compuestos hidrofílicos cargados negativamente y proteínas sulfatadas. Algunas especies también contienen ácidos grasos y fosfolípidos.
- **Exocutícula o corteza.** Se divide en dos capas diferentes: la externa es relativamente homogénea, sin estructura visible, y la interna, con estrías radiales. Se compone de abundantes proteínas semejantes a queratina y con alto contenido en cuticulina.
- **Mesocutícula o capa media.** Se trata de un compartimento acuoso con fibras de colágeno orientadas oblicuamente, que pueden variar en número y en el ángulo que forman entre ellas. En algunos nematodos, el grosor de la mesocutícula es directamente proporcional a la edad del parásito.

- Endocutícula o capa basal compuesta. Es la capa más interna de la cutícula y está formada por fibras de colágeno entrecruzadas en dos o tres capas diferentes que rodean al nematodo formando una espiral. La capacidad de las subcapas de la mesocutícula para desplazar sus ángulos de orientación junto con la disposición de las fibras de colágeno, aportan flexibilidad y elasticidad a esta capa, permitiendo el movimiento del gusano.

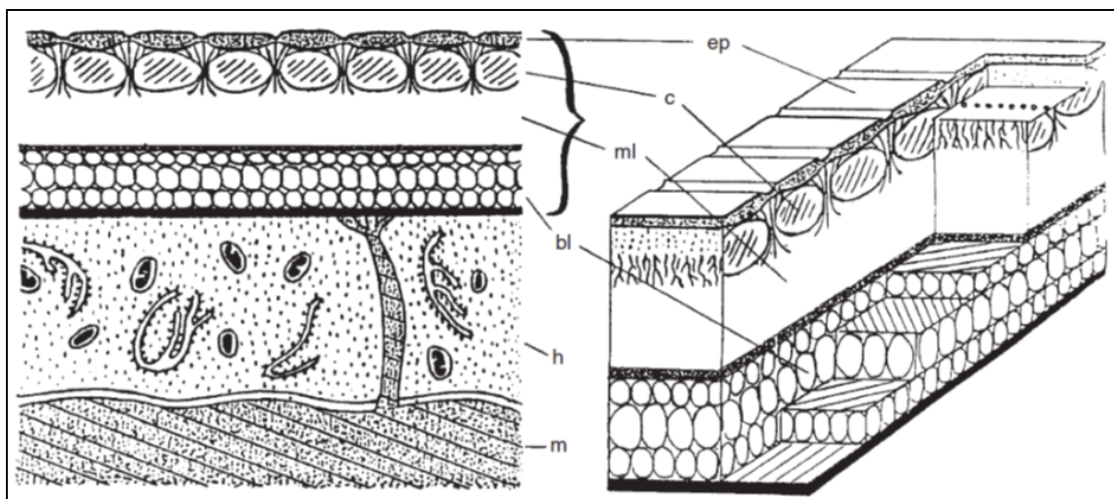


Figura 1.3. Esquema de la estructura de la cutícula de los nematodos. Abreviaturas: ep: epicutícula; c: corteza; ml: capa media (acuosa); bl: capa basal compuesta; h: hipodermis; m: músculo. (Thompson y Geary 2003).

Los nematodos mudan su cutícula 4 veces, una por cada estadio larvario, en un proceso que consta de las siguientes etapas: formación de una nueva cutícula, desprendimiento de la cutícula anterior, ruptura de la cutícula anterior y salida de la larva. Esta secuencia de eventos está controlada por el líquido de muda, secretado por la larva, que digiere la cutícula en puntos específicos de su superficie provocando su desprendimiento. Además, la capacidad del nematodo para formar una nueva cutícula en la hipodermis le permite desarrollarse y aumentar de tamaño entre las mudas (Bogitsh et al., 2013a).

La cutícula constituye una matriz de colágeno acuosa cargada negativamente que limita el paso de moléculas según su tamaño y carga (Ho et al., 1992). En el caso de moléculas neutras, su permeabilidad varía de forma inversamente proporcional a su tamaño (Thompson y Geary, 2003), mientras que el paso de sustancias cargadas depende de su pKa y del pH del medio. Las sustancias con carga positiva atraviesan la cutícula con más facilidad que las neutras, a igualdad de tamaño, en tanto que las de carga

negativa, presentan una permeabilidad inferior (Thompson y Geary, 2003; Zhu et al., 2013).

Algunos nematodos como *H. contortus* y *A. suum* también presentan un sistema de excreción de ácidos orgánicos a través de la cutícula, que condiciona la entrada de sustancias por esta vía. Se trata de productos procedentes del metabolismo, que les permiten mantener un pH cercano a 5 en el interior de la cutícula. Este mecanismo determina la tasa de absorción de xenobióticos con carácter ácido o base débil y su paso al interior del nematodo, independientemente del medio en el que se encuentren (Sims et al. 1996).

Hipodermis

La hipodermis es una estructura de tipo multicelular o sincitial en la que se forman la mayor parte de las proteínas de la cutícula. Se encuentra separada de la cubierta externa por la hipocutícula (Geary et al., 1995), una membrana lipídica que constituye una barrera al paso de moléculas polares (Ho et al., 1992).

La hipodermis se proyecta dentro del pseudoceloma a lo largo de las líneas medio dorsal, medio ventral y lateral para formar los cordones hipodérmicos longitudinales. Éstos dividen el pseudoceloma en cuadrantes y limitan la localización de los orgánulos, tales como el núcleo y la mitocondria. Los cordones laterales son los más largos y contienen los canales excretores, mientras que los cordones ventral y dorsal contienen los troncos nerviosos (Bogitsh et al., 2013a) (Figura 1.4).

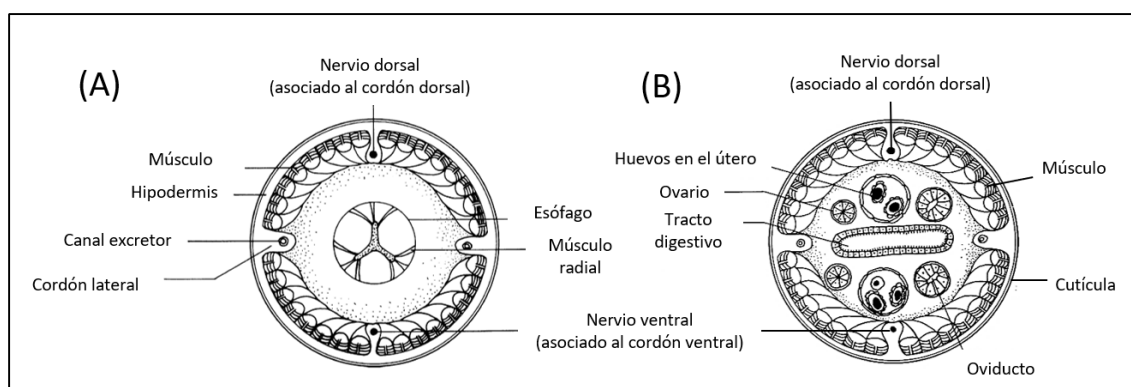


Figura 1.4. Disposición de los cordones en la zona esofágica (A) y media intestinal (B). (Bogitsh et al., 2013a).

Musculatura

En asociación con la hipodermis, se encuentran una o más capas longitudinales de células musculares. Cada célula muscular se compone de una parte contráctil que contiene miofibrillas y una parte no contráctil en la que se encuentran el núcleo, la mitocondria, y el retículo endoplasmático, así como el almacén de glucógeno y lípidos. Las capas de células musculares están conectadas a la cutícula por medio de fibras, originadas en la parte contráctil de cada célula, que se unen a la endocutícula (Bogitsh et al., 2013a) (Figura 1.3).

Tracto digestivo

En general, la mayor parte de las especies presenta un tracto digestivo completo, formado por un intestino constituido por 3 partes principales (zona anterior, zona media y zona terminal) (Bogitsh et al., 2013a) (Figura 1.2).

- La zona anterior se compone de la boca y el esófago. La boca puede formar una cápsula bucal, que suele contener estiletes, o dientes para adquirir alimento o penetrar en el hospedador. El esófago es una estructura alargada y alineada con la cutícula, que consta de zonas glandulares y musculares. Según la especie, la parte glandular puede estar formada por glándulas unicelulares o de mayor tamaño, distribuidas a lo largo del esófago. Las glándulas producen enzimas digestivas, de manera que los nutrientes son ingeridos y procesados en la parte anterior del intestino para su digestión final y absorción en la parte media.
- La zona media se comunica con la parte anterior a través de la válvula esófago-intestinal. Se trata de un tubo recto, con una sola capa de células que contienen microvellosidades y un glucocálix prominente. La parte media del intestino no tiene musculatura, por lo que los alimentos se mueven hacia la parte posterior por la actividad muscular de la parte anterior del intestino y el movimiento corporal. En algunos nematodos, la digestión es extracelular, mientras que en otros puede ser tanto intracelular como intercelular.
- La parte posterior del intestino o recto, es un tubo corto, aplanado, rodeado por la cutícula. En las hembras, esta zona del intestino une la parte media con el ano. En los machos, las secreciones del aparato reproductor que circulan por los vasos deferentes desembocan en la parte terminal, denominada cloaca.

En algunas especies y estados de desarrollo, el tracto digestivo puede no ser totalmente funcional, al encontrarse total o parcialmente ocluido.

Jenkins *et al.* (1971) observaron que las larvas L2 de *Ascaris suum* de vida libre carecían de lumen en el intestino. No obstante, tras la infección del hospedador vertebrado, presentaban lumen y desarrollaban células intestinales con borde en cepillo (Jenkins y Erasmus 1971).

Las investigaciones *in vitro* realizadas por Geary *et al.* (1993) en el nematodo *Haemonchus contortus* indicaron que el metabolismo de la glucosa no se altera al paralizar la faringe con el fármaco ivermectina, lo que sugiere la entrada de glucosa por vías alternativas (Geary *et al.*, 1993). Asimismo, Hütteman *et al.* (2007) mostraron que la forma intestinal de *Trichuris muris* podría alimentarse de nutrientes de bajo peso molecular absorbidos mediante estructuras como las células bacilares en su superficie corporal (Hüttemann *et al.*, 2007). A la luz de estas investigaciones, se concluye que la cutícula puede constituir una vía de absorción en estos organismos en determinadas etapas de su desarrollo (Alvarez *et al.*, 2007; Thompson y Geary, 2003).

Sistema nervioso

El sistema nervioso de los nematodos contiene dos centros nerviosos principales: la comisura circumesofágica, que rodea el esófago, y la comisura rectal, que se dispone alrededor de la parte posterior del tubo digestivo. La primera presenta varios ganglios asociados de los que emanan los nervios longitudinales anteriores y posteriores. Los nervios posteriores están embebidos en los cordones hipodérmicos dorsal y ventral, e inervan los órganos en las regiones posteriores del organismo (Quiroz Romero, 1999) (Figura 1.2). Los nervios periféricos se ramifican desde los principales troncos longitudinales y forman mecanorreceptores, como las papilas, alrededor de la cápsula bucal y quimiorreceptores, como los anfidos y los fásmidos, en la cutícula (Bogitsh *et al.*, 2013b).

Sistema excretor

Los nematodos presentan un sistema excretor osmorregulado. Según la especie, disponen de una o dos renetas, grandes glándulas unicelulares, que están asociadas a canales excretores para desembocar en un poro excretor. Las renetas y el poro excretor

suelen encontrarse en la parte anterior, mientras que los canales transcurren a lo largo del nematodo, disponiéndose en la hipodermis lateral. Algunas especies pueden contener una ámpula contráctil que permite el vaciamiento del sistema (Bogitsh et al., 2013b).

Sistema reproductor

Los nematodos son dioicos, de forma que el sexo masculino y femenino se encuentran en individuos diferentes (Mehlhorn, 2008) (Figura 1.2).

En el macho, el aparato reproductor está formado por uno o dos testículos de forma tubular, formados en su mayor parte por un tubo deferente que llega a la vesícula seminal, el conducto eyaculador y la cloaca. Anexo al aparato reproductor, se encuentran estructuras quitinosas variables en número y tamaño, llamadas espículas, que permiten la cópula (Quiroz Romero, 1999). El espermatozoide de los nematodos está formado por células redondas que se desplazan mediante pseudópodos (Bogitsh et al., 2013b).

La hembra dispone de uno o dos ovarios en forma de tubo en donde se forman los óvulos, que pasan al oviducto. También dispone de dos úteros que desembocan en la vagina, que comunica al exterior por la vulva (Quiroz Romero, 1999).

1.1.2. Modelo de nematodosis intestinal: *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis es un nematodo de la familia de los *Trichinellidae*, descrito por Richard Owen en 1835. Se trata de uno de los principales agentes causantes de la trichinellosis en mamíferos carnívoros y en algunos omnívoros (Campbell, 1983).

Su infección en el hombre se presenta generalmente como una patología intestinal, debido al consumo de carne cruda o poco cocinada infectada (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Los principales animales portadores de larvas de *T. spiralis* son el cerdo doméstico, el jabalí, el caballo y el perro, aunque también pueden proceder del venado (Murrell y Pozio, 2011; Noeckler et al., 2019; Rostami et al., 2018).

1.1.2.1. Ciclo biológico de *T. spiralis*.

T. spiralis presenta un ciclo biológico autoheteroxeno, en el que el mismo individuo hace las veces de hospedador definitivo (fase intestinal), actuando también

como hospedador intermediario (fase muscular). Estas etapas están separadas por una fase intermedia migratoria (Figura 1.5).

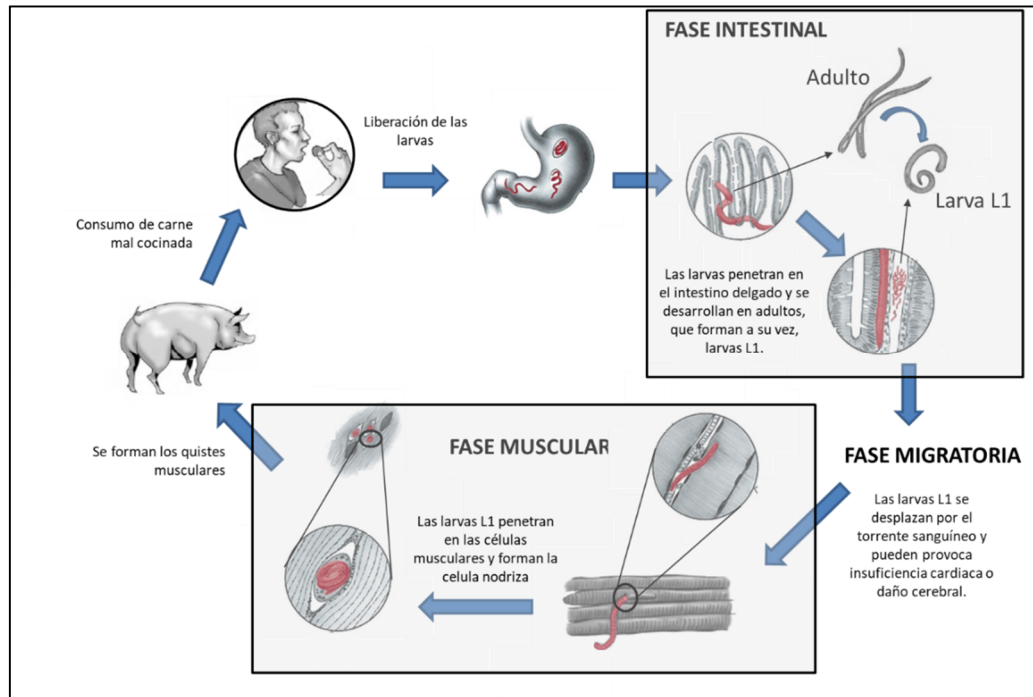


Figura 1.5. Ciclo biológico de *T. spiralis*. (Bogitsh, Carter, y Oeltmann 2013b; Mitreva 2006).

En la fase intestinal, los gusanos adultos se disponen generalmente en el duodeno, introduciéndose en el citoplasma de las células del epitelio columnar de la mucosa. Tal es el nivel de adaptación entre el parásito y el hospedador, que las células intestinales se ajustan para acomodar al nematodo. Esta etapa puede durar semanas o meses, según la respuesta inmunitaria del hospedador (Figura 1.5) (Campbell, 1983).

Los gusanos adultos tienen un aspecto filiforme, ligeramente ensanchado en la región posterior. Los machos miden 1,5 mm de longitud, y su esticosoma ocupa los dos tercios anteriores del cuerpo. En el extremo posterior posee dos prominencias lateroventrales, auxiliares de la cópula y entre ellas, dos pares de papilas (Campillo y Vázquez, 2000).

Las hembras miden aproximadamente el doble que los machos, hasta 4 mm de longitud. Su esticosoma ocupa el tercio anterior del cuerpo y a continuación se encuentra el aparato genital prodelfo. El ovario se dispone en la zona caudal, seguido del útero, que contiene los huevos en desarrollo al avanzar por la región uterina y finalmente, la vagina, que permite la salida de los embriones (Berenguer, 2007; Campillo y Vázquez, 2000).

Las hembras producen unas 1.500 larvas durante su vida. Las larvas disponen de un estilete bucal que les permite penetrar a través de la lámina propia de la pared intestinal y desplazarse a través de la sangre y del sistema linfático al resto de los órganos del hospedador (fase migratoria) (Figura 1.5) (Lee, 2002).

A través de los capilares sanguíneos, las larvas acceden a las células tisulares y penetran en su citoplasma, lo que suele implicar la muerte celular. En cambio, las fibras musculares estriadas esqueléticas son capaces de sobrevivir y dar soporte al desarrollo de la larva L1. Ésta se rodea de una membrana en el citoplasma de la fibra muscular y produce secreciones que inducen la formación de núcleos hipertróficos, pérdida de miofibrillas y otros orgánulos para dar lugar a la célula nodriza (fase muscular) (Figura 1.5) (Lee, 2002). Los músculos más frecuentemente infectados son los músculos extraoculares, los maseteros, los músculos de la lengua y de la laringe, el diafragma, los músculos del cuello, los intercostales y el deltoides (Gould, 1970).

La célula nodriza, controlada por la larva, queda encapsulada en fibras de colágeno y una red de capilares. El ciclo celular de la célula también queda bloqueado, en la fase G₂/M¹. Sin embargo, se mantienen el retículo endoplasmático liso y el complejo de Golgi, cuyas vesículas atraviesan el citoplasma para vaciar su contenido en el interior de la cavidad de nematodo. Estos cambios químicos en la célula nodriza duran unos 20 días, hasta que la larva alcanza su tamaño definitivo (Despommier et al., 1975; Lee, 2002). Posteriormente, tiene lugar la calcificación de la cápsula de colágeno, dando lugar a los quistes musculares. Las larvas pueden permanecer en este estado durante varios años, dependiendo del sistema inmunológico del hospedador (Figura 1.5) (Gottstein et al., 2009).

Cuando un hospedador adecuado se alimenta de la carne infectada, las larvas L1 se liberan durante la digestión, implantándose en la pared intestinal, donde sufren 4 mudas antes de convertirse en gusanos adultos machos o hembras (Figura 1.5) (Lee, 2002). El desarrollo de las larvas dura entre 30 y 34 horas (Campbell, 1983; Stewart et al., 1987).

¹ La fase G₂/M se refiere al momento entre la etapa final de la interfase y el inicio de la mitosis. Se trata de un punto de control celular que evita que la célula inicie la mitosis en caso de que presentar daños en el ADN durante la etapa G₂ (Yang, 2012).

1.1.2.2. Modelo murino de *T. spiralis* utilizado en investigación.

En los últimos años, las infecciones causadas por *T. spiralis* se han reducido gracias a los controles obligatorios que deben pasar los alimentos en la mayor parte de los países desarrollados (Murrell y Pozio, 2011). Sin embargo, debido a su ciclo biológico autoheteroxeno, que sólo requiere de un hospedador para completarse, y al corto periodo de tiempo necesario para completar su desarrollo, *T. spiralis* se sigue utilizando actualmente en investigación, en modelos murinos *ex vivo* e *in vivo*. Estos modelos experimentales se han utilizado tanto para estudiar la respuesta inmunológica del hospedador frente al parásito (Carlisle et al., 1991; Khan, 2008; Ortega-Pierres et al., 2015), como para el análisis de la actividad nematocida de nuevas sustancias y formulaciones en los diferentes estadios de desarrollo (Casulli, 2006; García-Rodríguez et al., 2015).

1.1.3. Tratamiento farmacológico de las nematodosis intestinales.

1.1.3.1. Bencimidazoles: albendazol

En las últimas décadas, las nematodosis intestinales han sido tratadas con bencimidazoles. Se trata de fármacos antihelmínticos de amplio espectro formados por un anillo bicíclico, en el que el benceno se fusiona en la posición 4 y 5 con imidazol. Son compuestos poco hidrosolubles, que se absorben irregularmente en el tracto digestivo, por lo que se utilizan principalmente para el tratamiento de infecciones locales en el intestino (Brunton y Goodman, 2008; Flórez, 2008; Rang et al., 2014).

El mecanismo de acción de los bencimidazoles consiste en la unión a la β -tubulina del nematodo, lo que provoca el bloqueo de la polimerización de los microtúbulos. Esta unión se produce con mayor afinidad en el parásito que en el hospedador, de forma que la división y la motilidad, así como otras funciones vitales, se ven alteradas en las células del nematodo (Lanusse et al., 2016). Los bencimidazoles también actúan inhibiendo la enzima fumarato reductasa mitocondrial, la absorción de glucosa y provocan el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Estas acciones en conjunto conducen a la muerte del nematodo (Brunton y Goodman, 2008; Flórez, 2008; Rang et al., 2014).

Entre los bencimidazoles, albendazol y mebendazol son los fármacos incluidos en la Lista de Medicamentos Esenciales para el tratamiento de helmintiasis intestinales

(OMS, 2017). No obstante, un reciente metaanálisis realizado por Moser *et al.* (2017), concluyó que albendazol, administrado en una única dosis, es eficaz frente a uncinarias, con una tasa de curación del 79,5% y una tasa de reducción de huevos del 89,6%, siendo superiores a las tasas alcanzadas con mebendazol (32,5% y 61,0%, respetivamente) (Moser *et al.*, 2017). Albendazol también forma parte de los programas de control promovidos por la OMS para la prevención de estas parasitosis (OMS, 2012).

1.1.3.2. Exposición del parásito a albendazol.

Actualmente, albendazol se comercializa en forma de comprimidos de administración oral² y su dosis varía en función de los parásitos implicados, del peso del paciente y de la gravedad de la infección. Además de las helmintiasis intestinales, está indicado para el tratamiento de otras helmintiasis sistémicas, como la equinococosis quística, la equinococosis alveolar y neurocisticercosis (AEMPS, 2004).

Debido a su baja solubilidad, albendazol presenta una escasa biodisponibilidad oral. La fracción que se disuelve en el medio intestinal atraviesa la mucosa y sufre un metabolismo de primer paso en el hígado, formando sulfóxido de albendazol como metabolito primario. Éste presenta una vida media plasmática de 8,5 horas y es la forma activa frente a la mayor parte de las parasitosis sistémicas (AEMPS, 2004) (Figura 1.6).

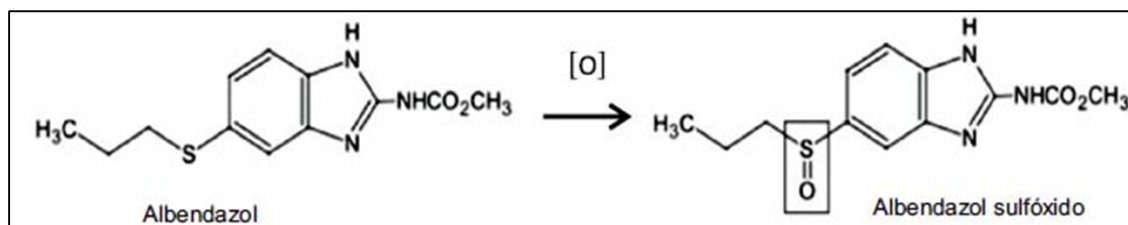


Figura 1.6. Metabolismo de primer paso hepático de albendazol. (Sun-Kou *et al.* 2013).

El efecto antiparasitario del fármaco puede producirse mediante el acceso al tubo digestivo del nematodo intestinal cuando se alimenta de la sangre portal. Asimismo, parte de la fracción disuelta del fármaco en el medio intestinal ejerce su acción antiparasitaria al atravesar la cutícula del nematodo. Los estudios realizados por Alvarez *et al.* en *Haemonchus contortus* muestran mayores concentraciones de albendazol y albendazol

² La única presentación de albendazol comercializada en España es Eskazole®, en comprimidos de 400 mg (AEMPS, 2004).

sulfóxido en el interior del parásito respecto de las encontradas en el interior del abomaso en ovejas. Sin embargo, las bajas concentraciones plasmáticas de albendazol en sangre portal no explican la concentración del fármaco en el interior del parásito. Por ello, se considera que la vía transcuticular puede constituir la principal vía de entrada del fármaco al interior del nematodo (Alvarez et al., 2000).

Por otro lado, aunque se detectaron altas concentraciones de albendazol sulfóxido en el abomaso, las concentraciones de este metabolito en el interior del parásito fueron menores respecto del compuesto en la circulación sistémica y portal, probablemente debido a las diferencias en su lipofilia, que dificultó el paso de albendazol sulfóxido a través de la cutícula del parásito. Se estima que la ingesta del metabolito a partir de la circulación periférica y portal puede haber contribuido a la cantidad de albendazol sulfóxido detectada en el parásito (Alvarez et al., 2000). Estos resultados están en consonancia con los registrados en *A. suum* frente a albendazol y fenbendazol, otro derivado bencimidazólico ampliamente utilizado en veterinaria (Alvarez et al., 2007, 2001). El principal mecanismo de entrada de estos fármacos a través la cutícula del parásito es la difusión pasiva. Por tanto, el gradiente de concentración, la solubilidad del fármaco y las características del medio de incubación son críticas para la penetración de los bencimidazoles (Alvarez et al., 2007, 2001, 2001; Mottier et al., 2006). En consecuencia, estos factores también determinan la obtención de concentraciones eficaces del fármaco en el lugar de acción (Lanusse et al., 2016).

1.1.4. Resistencias al tratamiento antihelmíntico.

A pesar de la eficacia antiparasitaria de los bencimidazoles, las últimas investigaciones indican que se están desarrollando resistencias frente a los antihelmínticos comúnmente utilizados, dando lugar a niveles de eficacia inferiores a los esperados. En el metaanálisis realizado por Moser *et al.*, (2017) se observó que la eficacia de curación de albendazol frente a *T. trichiura* disminuyó desde 38,6% en 1995 a 16,4% en 2015. Asimismo, se observó una disminución en la tasa de reducción de huevos de 72,6% a 43,4%, respectivamente (Moser et al., 2017).

1.1.4.1. Mecanismos de resistencia en nematodos

La resistencia a bencimidazoles se ha correlacionado con mutaciones en los genes que codifican la β -tubulina. Estos cambios genéticos dan lugar a proteínas modificadas,

hacia las que el fármaco presenta menor afinidad (Aguayo-Ortiz et al., 2013; Furtado et al., 2014; Lacey, 1988; Schwenkenbecher et al., 2007).

Otro mecanismo de resistencia consiste en la presencia de enzimas con funciones de detoxificación, que metabolizan los compuestos xenobióticos protegiendo al nematodo de los efectos antihelmínticos. Así, en ciertas poblaciones de *H. contortus* se han detectado niveles elevados de UDP-glucosiltransferasas, enzimas que conjugan albendazol con glucosa, disminuyendo el efecto tóxico del fármaco y contribuyendo a la resistencia de esta especie (Vokřál et al., 2013).

También se ha observado el desarrollo de glucoproteínas P modificadas que alteran los procesos de absorción y transporte de xenobióticos a través de las membranas celulares del parásito. Estas proteínas se han encontrado en células del intestino de *H. contortus*, siendo capaces de reducir el acceso de los bencimidazoles a su diana terapéutica (Blackhall et al., 2008).

1.1.4.2. Estrategias terapéuticas frente a las resistencias.

El desarrollo de mecanismos de resistencia en parásitos intestinales ha llevado a incrementar las dosis de los antihelmínticos generalmente utilizados. Sin embargo, esta estrategia puede estar provocar la selección de nematodos altamente resistentes, así como el desarrollo de reacciones de toxicidad en el hospedador (Lanusse et al., 2016).

También se han utilizado procedimientos farmacotécnicos para mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad de los bencimidazoles, especialmente del albendazol y mebendazol, para aumentar su eficacia nematocida. Algunos de ellos son la formación de complejos de povidona (Daniel-Mwambete et al., 2004), su inclusión en ciclodextrinas (Castillo et al., 1999) y su formulación en nanocristales (Paredes et al., 2018) y sistemas auto-microemulsionables (SMEDDS) (Sawatdee et al., 2019). Sin embargo, estas nuevas formulaciones todavía se encuentran en desarrollo.

Otra estrategia consiste en la combinación de dos o más antihelmínticos con diferentes mecanismos de acción. En una revisión sistemática reciente, se observó que la combinación de ivermectina y albendazol presenta una tolerabilidad adecuada y mayor eficacia frente a *T. trichuria* respecto al albendazol en monoterapia. Las tasas de reducción de huevos tras el uso de la combinación fueron del 91 - 100%, mientras que la

administración de albendazol en monoterapia mostró tasas de reducción inferiores. Sin embargo, no se observaron diferencias entre la combinación de antihelmínticos y la administración de albendazol frente a las uncinurias y las infecciones de *A. lumbricoides* (Palmeirim et al., 2018).

En los últimos años también se ha desarrollado una nueva clase de fármacos antihelmínticos, los derivados del amino-acetonitrilo (AAD). Los AADs actúan como agonistas del receptor nicotínico de acetilcolina, provocando una parálisis espástica y la muerte del gusano. Aunque ya han demostrado su eficacia frente a nematodos multirresistentes en el ámbito veterinario (Sager et al., 2009), todavía se trata de un grupo farmacológico en investigación (Kotze y Prichard, 2016; Lamb et al., 2017; Lanusse et al., 2016).

El uso de remedios naturales a base de plantas es otra de las estrategias terapéuticas utilizadas frente a los parásitos intestinales (Boubaker Elandalousi et al., 2013; Preston y Gasser, 2018; Wink, 2012). Durante el proceso evolutivo, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa físicos y químicos frente a patógenos, herbívoros y otros atacantes. Los extractos con propiedades antihelmínticas constituyen una alternativa segura, sostenible y respetuosa con el medio ambiente para el control de estas nematodosis (Tariq et al., 2009).

1.2. EL USO DE *ARTEMISIA* SPP. EN EL TRATAMIENTO DE LAS NEMATODOSIS INTESTINALES.

El género *Artemisia* está ampliamente distribuido en Asia, Europa y Norte América. De las 500 especies que lo componen, al menos 260 presentan metabolitos secundarios con interés etnofarmacológico, debido a su actividad antimalárica, citotóxica, antihepatotóxica, antibacteriana, antifúngica y antioxidante (Abad et al., 2012; Sainz et al., 2017).

Los extractos de *Artemisia* spp. también se han utilizado de forma tradicional frente a nematodos intestinales (Romero-Benavides et al., 2017). En este sentido, Irum y colaboradores compararon la eficacia del extracto metanólico de las hojas, tallos y raíces de las especies *A. marítima* y *A. vestita* respecto de levamisol³, frente al nematodo ovino *Haemonchus contortus*. Las ovejas previamente infectadas se dividieron en grupos de 5 animales. Los extractos vegetales se administraron en dosis única por vía oral de 50 mg/kg, mientras que el fármaco se administró en dosis de 7,5 mg/kg. A las cuatro semanas de recibir el tratamiento, se observó que la reducción de huevos de *H. contortus* fue similar entre las ovejas tratadas con *A. marítima* (82,2%), *A. vestita* (86,36%) y levamisol (88,9%). Por tanto, estos resultados mostraron que los extractos de *Artemisia* spp. pueden ser utilizados como tratamiento antihelmíntico alternativo a los fármacos de síntesis (Irum et al., 2015).

Entre los compuestos con actividad antiparasitaria, se han identificado saponinas, alcaloides, aminoácidos, taninos y otros polifenoles (Durmic y Blache, 2012; Hoste et al., 2012), cuyo efecto a menudo se debe a la acción sinérgica de sus combinaciones (Ferreira, 2009). El procedimiento de extracción determina la composición de los extractos, y por tanto, su actividad terapéutica (Abad et al., 2012; Githiori et al., 2006). Se ha observado que los principios activos con actividad antihelmíntica son más solubles en disolventes como etanol o metanol, lo que también favorece el paso de estos principios activos a través de la cutícula de los nematodos intestinales. Por ello, los extractos metanólicos o

³ Levamisol es un fármaco antihelmíntico ampliamente utilizado en veterinaria (Adediran and Uwalaka, 2015; Irum et al., 2015).

etanólicos suelen presentar mayor actividad antiparasitaria respecto de los extractos acuosos (Iqbal et al., 2004).

1.2.1. *Artemisia absinthium* en la Península Ibérica.

De entre las especies del género *Artemisia* spp, *A. absinthium* tiene una amplia distribución geográfica en la Península Ibérica (Sainz et al., 2017). Se trata de una planta perenne, herbácea, ramificada y leñosa en la base, que crece hasta 130 cm de altura. Cada año se forman ramas rectas desde la base, que se secan en otoño tras la fructificación, y producen nuevas ramas a partir de sus yemas tras el invierno. Las hojas tienen 8 cm de longitud y 3 cm de ancho. El tallo y las hojas tienen una coloración blanquecina debido a la presencia de pelos, que contienen glándulas productoras del aceite esencial. Las flores son pequeñas y globulares, organizadas en umbelas (Bailén 2008; Wright 2002).

La planta se recolecta durante la floración, que tiene lugar entre los meses de julio y octubre. La recolección del primer año es escasa, pero en los años sucesivos se pueden hacer dos recolecciones, una en julio y otra a finales de octubre (Bailén 2008; Wright 2002). Aunque la forma de recolección más común suele ser a partir de cultivos, en muchas regiones se recogen poblaciones silvestres de esta planta, dando lugar a un producto heterogéneo en calidad y rendimiento (Bailén 2008).

La composición química de los extractos procedentes de plantas de diferente localización ha permitido definir distintos quimiotipos, asociados a actividades terapéuticas específicas, de tipo antifúngico, nematocida, antibacteriano e insecticida (Ariño et al., 1999; Sainz et al., 2017). Sin embargo, los extractos de ciertos isotipos presentan α - y β - tujonas, un antagonista de los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA), que presentan efectos neurotóxicos, condicionando el uso terapéutico de estos extractos (Abad et al., 2012; Lachenmeier, 2010; Wright, 2002) (Figura 1.7).

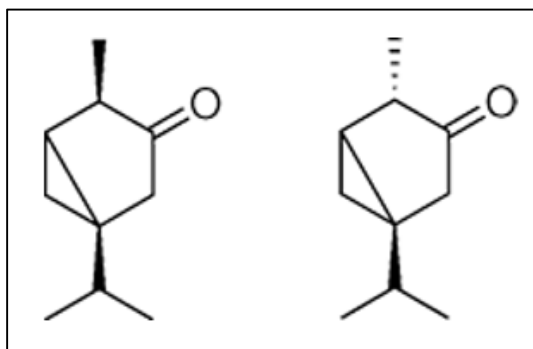


Figura 1.7. Estructura molecular de los derivados monoterpénicos alfa-tujona (Izda.) y beta-tujona (Der.). (European Commision, 2002).

1.2.2. Nuevos cultivos de *Artemisia absinthium*.

En los últimos años, algunas poblaciones de *A. absinthium* carentes de tujonas han sido cultivadas de forma experimental en Ejea de los Caballeros (Zaragoza), en unas investigaciones llevadas a cabo por el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA) (Martín *et al.* 2011; Bailen *et al.* 2013; Gonzalez-Coloma *et al.* 2012) (Figura 1.8). A partir de estas poblaciones, se han obtenido diferentes extractos utilizando disolventes orgánicos, así como técnicas de hidrodestilación y fluidos supercríticos. Dichos extractos han demostrado propiedades insecticidas, antifúngicas y antiparasitarias (Julio *et al.*, 2015; Martínez-Díaz *et al.*, 2015).

Una de las poblaciones cultivadas de forma experimental fue originaria del Parque Nacional de Sierra Nevada. Las semillas se plantaron en 2008 en un invernadero en Zaragoza, dando lugar a una población predomesticada de especímenes de *A. absinthium* (SN1). Las plantas fueron recolectadas durante su floración en el año 2010 (SN1-2010). Las partes utilizadas fueron las hojas y las sumidades floridas (García-Rodríguez *et al.*, 2015; Julio *et al.*, 2015).

La composición química de los extractos de la población SN1-2010, obtenidos por hidrodestilación o destilación por arrastre de vapor, fue analizada mediante cromatografía de gases asociada a espectrofotometría de masas. Los resultados mostraron que el (Z)-epoxiocimeno es el componente principal (38,77%) del aceite esencial, seguido de crisantenol (22,49%). Por ello, esta población de *A. absinthium* pertenece al quimiotipo (Z)-epoxiocimeno + (Z)-crisantenol. Otros derivados terpénicos fueron (E)-cariofileno (5,43%), linalool (3,54%) y germacreno D (1,86%). Se observa que ninguno de los

extractos analizados contiene α - y β - tujonas (Tabla 1.1) (Figura 1.9) (García-Rodríguez et al., 2015; Julio et al., 2015).

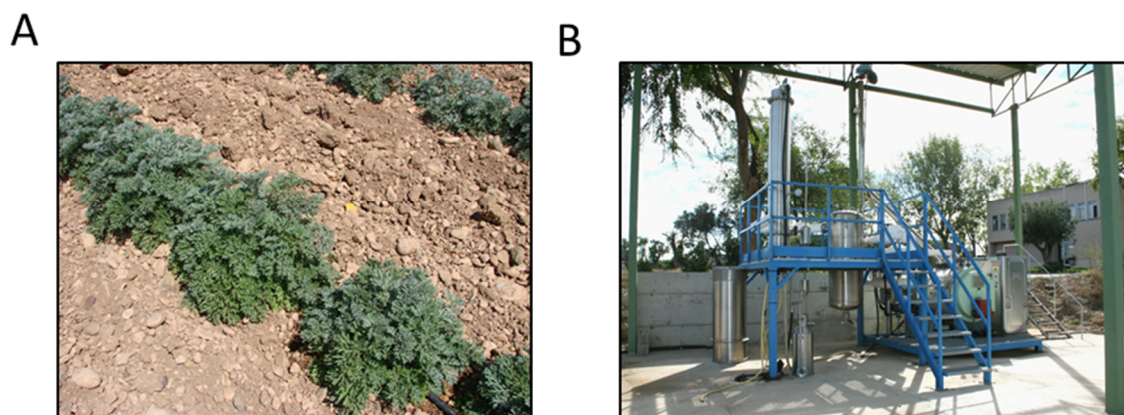


Figura 1.8. Aspecto de los cultivos de *A. absinthium* en Ejea de los Caballeros (Zaragoza) (A) y planta piloto de extracción (B). (Burillo, 2012; CITA, 2013).

Tabla 1.1. Composición del aceite esencial de la población SN1 de *A. absinthium* recolectada en 2010. (García-Rodríguez et al., 2015).

Compuesto	Composición (% respecto del total)
α -Pino	1,62
Canfeno	-
β -mirceno	1,13
β -ocimeno	1,27
1,8-cineol	-
Linalool	3,54
[M]+152 (81 68-79-41-53)*	0,49
(Z)-epoxiocimeno	38,77
(E)-epoxiocimeno	2,16
(Z)-crisantenol	22,49
(E)-3-hexenil butirato	1,64
Acetato de crisantenilo	0,46
(5Z)-2,6-dimetilocta-5,7-dien-2,3-diol	1,90
β -elemene	2,57
(E)-cariofileno	5,43
Germacrene D	1,86
Alcohol sesquiterpeno	0,74
7-etil-1,4-dimetilazuleno	-

Nota: *compuesto no conocido.

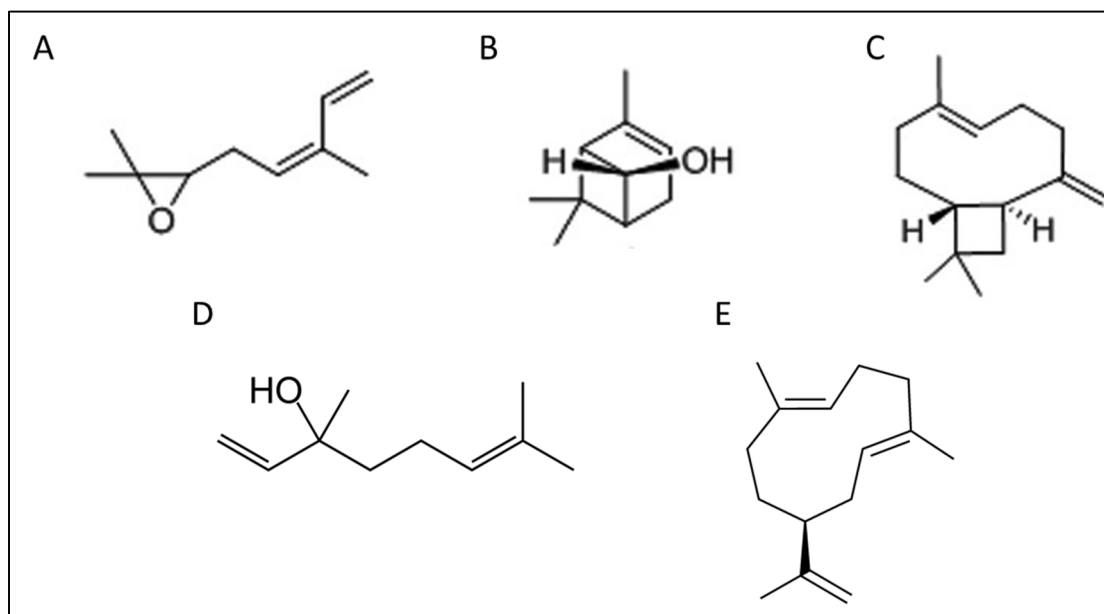


Figura 1.9. Estructuras químicas de los compuestos (Z)-epoxiocimeno (A), (Z)-cristantanol (B), (E)-cariofileno (C), linalool (D) y germacreno D (E). (NIST, 2016).

La actividad nematocida del aceite esencial de la población SN1-2010 fue analizada en un modelo murino de *T. spiralis*. Para ello, se llevaron a cabo experimentos *ex vivo* e *in vivo* a diferentes concentraciones y dosis, analizando la tasa de reducción larvaria intestinal a los 7 días post-infección respecto del grupo control. Los estudios *ex vivo* mostraron que concentraciones de entre 0,5 y 1,0 mg/mL del extracto presentaban una tasa de reducción larvaria intestinal superior al 80%, obteniéndose valores superiores al 25% con la dosis de 0,03 mg/mL (Figura 1.10) (García-Rodríguez et al., 2015).

Esta eficacia nematocida se confirmó en los experimentos *in vivo*. Los ratones previamente infectados con larvas L1 de *T. spiralis* recibieron dosis de entre 50 y 500 mg/kg del extracto y registraron tasas de reducción larvaria intestinal del 0,22 al 65,16%. Los resultados muestran que a partir de 250 mg/kg, el efecto del aceite esencial se mantiene constante (Figura 1.10). Asimismo, albendazol fue utilizado como fármaco de referencia a dosis de 5 mg/kg, obteniendo una tasa de reducción larvaria intestinal del 65,97%, similar a la registrada tras utilizar dosis de 500 mg/kg del aceite esencial de *A. absinthium* (65,16%) (García-Rodríguez et al., 2015).

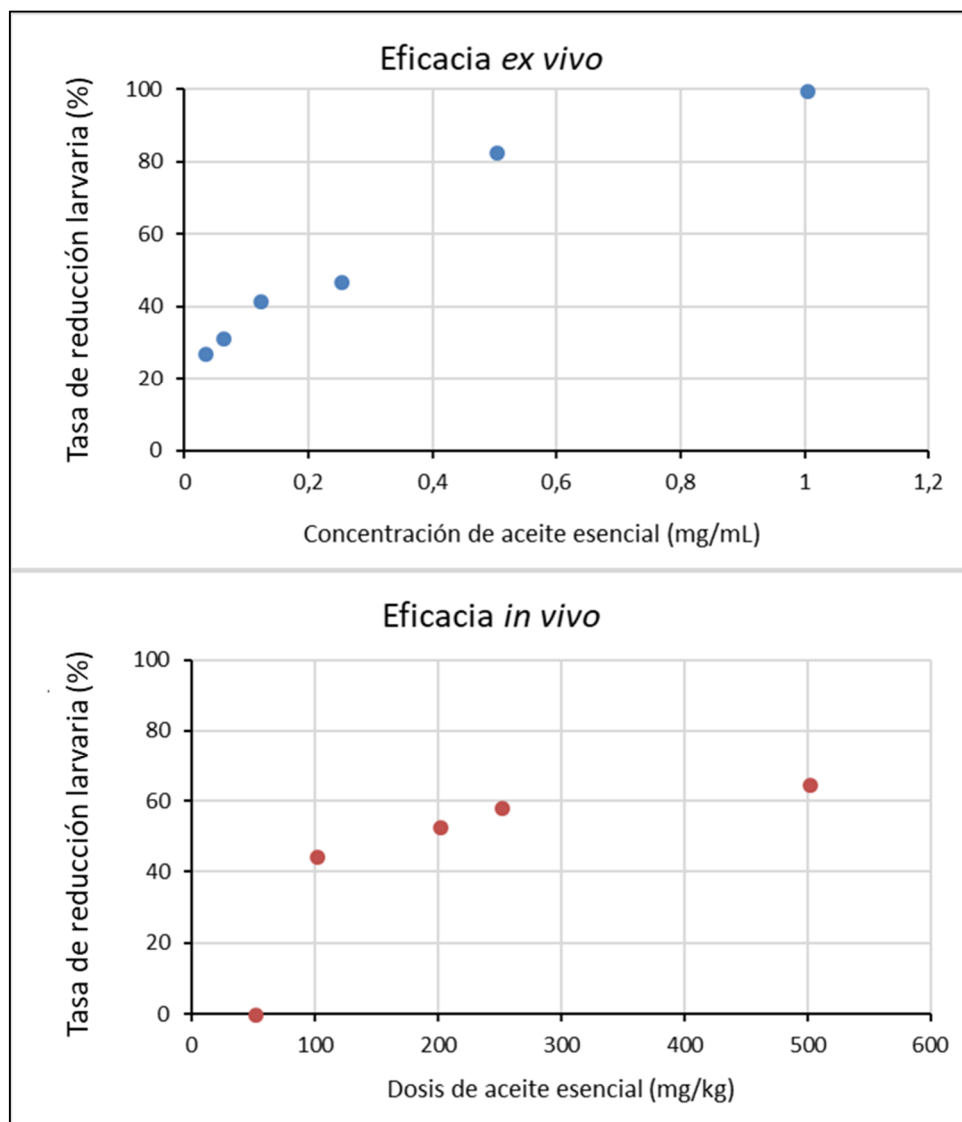


Figura 1.10. Eficacia *ex vivo* e *in vivo* del aceite esencial de *A. absinthium* SN1-2010 en un modelo murino de *T. spiralis*. (García-Rodríguez et al., 2015).

Asimismo, los extractos de *A. absinthium* no mostraron actividad citotóxica en macrófagos (inhibición del crecimiento <20%), siendo la máxima concentración del extracto analizada de 200 $\mu\text{g/mL}$ (García-Rodríguez et al., 2015).

De este modo, el aceite esencial procedente de una población predomesticada de *A. absinthium* constituye una alternativa para el tratamiento de infecciones provocadas por nematodos intestinales resistentes a los fármacos antihelmínticos comúnmente utilizados. Sin embargo, el carácter oleoso de este extracto requiere del desarrollo de diferentes formulaciones que faciliten su dosificación y mejoren su biodisponibilidad.

1.3. ESTRATEGIAS DE FORMULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES.

La Organización Internacional de Normalización (en inglés, ISO) define los aceites esenciales como: “Productos olorosos obtenidos de material vegetal crudo, bien por destilación con agua o vapor, o desde el epicarpio de cítricos por un proceso mecánico por destilación seca” (ISO, 2013). Los aceites esenciales se componen principalmente de moléculas apolares de bajo peso molecular y presentan puntos de evaporación bajos, por lo que son capaces de volatilizarse a temperatura ambiente (Sherry et al., 2013).

Debido a su composición, los aceites esenciales son productos sensibles a los factores medioambientales, por lo que pueden ser rápidamente degradados como consecuencia de la luz, el oxígeno o la temperatura (El Asbahani et al., 2015). De este modo, los terpenoides tienden a ser volátiles y termolábiles, con tendencia a oxidarse o hidrolizarse dependiendo de su estructura. Además, la degradación de los aceites esenciales suele estar asociada a cambios en sus propiedades organolépticas, características fisicoquímicas y actividad terapéutica (Turek y Stintzing, 2013).

Por ello, se han desarrollado diferentes tipos de formulaciones que protegen las propiedades de los extractos y mejoran su estabilidad, vehiculizando sus componentes para optimizar su acción (Baser et al., 2015; Choi et al., 2009; Hosseini et al., 2013). Entre estas estrategias destaca el desarrollo de formulaciones lipídicas como microemulsiones.

1.3.1. Formulación de aceites esenciales: microemulsiones

1.3.1.1. Definición de microemulsión.

Las microemulsiones son dispersiones coloidales, ópticamente isotrópicas y termodinámicamente estables, formadas por una fase oleosa, una fase acuosa y emulgentes, con o sin la incorporación de un coemulgente (Birdi, 2016; Boonme et al., 2006; Rakshit y Moulik, 2008). A diferencia de las emulsiones convencionales, las microemulsiones presentan un tamaño de gotícula pequeño, de entre 20 y 200 nm, lo que favorece el paso de los principios activos, tanto hidrófilos como lipófilos, a través de la membrana de las mucosas (Affandi et al., 2012; Birdi, 2016; Parthasarathi et al., 2016; Wang et al., 2009). Además, el pequeño tamaño de las gotículas de la fase interna hace que no sean capaces de dispersar las longitudes de onda del espectro visible, de forma que las microemulsiones tienen un aspecto transparente -a diferencia de las emulsiones,

que suelen presentar un aspecto opalescente- que puede mejorar su aceptación en el mercado (Birdi, 2016; Boonme et al., 2006; Gelbart et al., 1994; Rakshit y Moulik, 2008).

Desde un enfoque biofarmacéutico, las microemulsiones son capaces de mantener principios activos poco solubles (clase II y IV del sistema biofarmacéutico de clasificación en fármacos-BCS) en dispersión, consiguiendo una liberación controlada o sostenida de los mismos y mejorando su biodisponibilidad. En un estudio llevado a cabo por Okonogi y Chaiyana, la microemulsión de un aceite esencial de *Zingiber cassumunar* mostró una mayor capacidad de inhibición de la acetilcolinesterasa y la butilcolinesterasa frente al extracto puro, demostrando que la formulación del extracto en microemulsión podría ser una alternativa prometedora para el desarrollo de productos naturales eficaces en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Okonogi y Chaiyana, 2012). Asimismo, otro estudio observó que una microemulsión de un extracto oleoso de clavo presenta actividades antioxidantes y antimicrobianas superiores al extracto puro. Estos resultados sugieren que las formulaciones basadas en estos extractos pueden ser utilizadas como desinfectantes y conservantes en productos de higiene y en la industria alimentaria (Hamed et al., 2012).

Las microemulsiones se forman de manera espontánea, por lo que son fáciles de preparar y escalar en el contexto de su fabricación industrial, permitiendo vehiculizar una amplia variedad de compuestos, como aceites esenciales, mejorando la estabilidad y biodisponibilidad de estos productos naturales (Stubenrauch et al., 2008; Xavier-Junior et al., 2017).

1.3.1.2. Emulgentes

Para favorecer la interacción entre la fase acuosa y oleosa, las microemulsiones incluyen emulgentes tipo tensoactivos, que disminuyen la tensión interfacial entre ambas fases. Los emulgentes tensoactivos son moléculas anfifílicas, en cuya estructura se distingue una parte con afinidad por la fase oleosa y otra con afinidad por la fase acuosa. Al incorporarlos sobre una fase oleosa y otra acuosa, las moléculas de emulgente migran a la interfaz formada por ambas fases, favoreciendo la interposición entre ambos líquidos inmiscibles (Birdi, 2016). La reducida tensión interfacial compensa las entropías de dispersión, haciendo que la mezcla sea termodinámicamente estable y se forme de manera espontánea (Xavier-Junior et al., 2017).

Los emulgentes se clasifican en dos tipos principales, iónicos y no iónicos. Los primeros presentan una carga positiva (catiónicos) o negativa (aniónicos) en su parte hidrófila. Los emulgentes aniónicos suelen presentar grupos carboxilato, sulfato o sulfonato, y se asocian a cationes de sodio, calcio o magnesio. En cuanto a los emulgentes catiónicos, suelen contener en su estructura grupos amonio, que se asocian a aniones tipo bromuro o cloruro. Sin embargo, debido a la elevada cantidad de emulgente que precisan las microemulsiones y a su formulación para administración por vía oral, se requieren emulgentes de tipo no iónico, que no presentan cargas en su estructura, por lo que tienen menor interacción con las células de la mucosa intestinal y son menos irritantes. Los principales emulgentes no iónicos son los derivados de sorbitano y los polisorbatos (Mason et al., 2006; Nielloud y Marti-Mestres, 2010).

La formulación de microemulsiones suele requerir de la inclusión de un coemulgente, que aumente la flexibilidad de la película interfacial del sistema bifásico, mejorando su estabilidad (Birdi, 2016; Boonme et al., 2006). Los coemulgentes son moléculas de pequeño tamaño que se adsorben a la interfaz aceite-agua. Actúan desordenando las cadenas alquílicas del emulgente e interfiriendo en sus interacciones, lo que disminuye la tensión interfacial y favorece la formación de la microemulsión (Figura 1.11). Los coemulgentes más utilizados son alcoholes, formados por una cadena alquílica de entre 3 y 6 carbonos, como propilenglicol o *sec*-butanol. Según los componentes y las características del sistema, la relación entre el emulgente y el coemulgente puede variar entre 1:0,5 hasta 1:3 (Birdi, 2016).

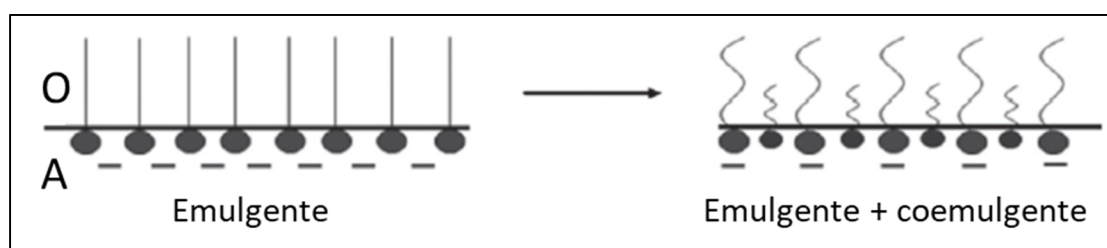


Figura 1.11. Disposición de las moléculas de emulgente y coemulgente en la interfaz entre la fase oleosa (O) y acuosa (A). (Romsted et al. 2014).

El incremento en el contenido de emulgentes en un sistema da lugar a diferentes organizaciones moleculares. En un sistema inicialmente constituido por agua y con un bajo contenido en emulgentes, las moléculas del tensoactivo apenas interaccionan entre sí, encontrándose en forma de monómeros. Posteriormente, el incremento en el contenido de emulgentes origina una monocapa en la interfaz agua-aire que compensa las presiones

a ambos lados de la interfaz. La concentración micelar crítica dará lugar a la formación de micelas esféricas, que se transformarán en cilíndricas y finalmente darán lugar a estructuras hexagonales, cúbicas y lamelares (Figura 1.12) (Birdi, 2016; Stubenrauch et al., 2008).

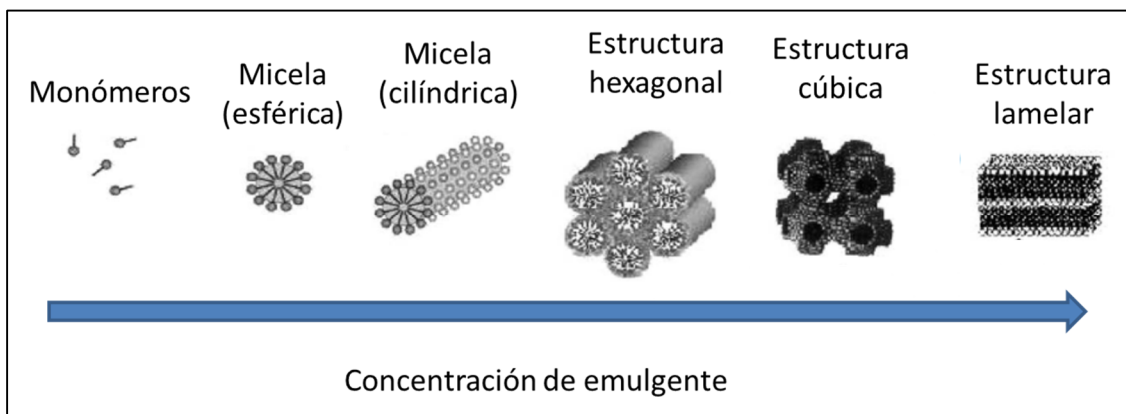


Figura 1.12. Cambio en la estructura del sistema, al incrementar su contenido en emulgente. (Birdi 2016).

En un sistema bifásico, los emulgentes suelen presentar mayor afinidad por alguna de las fases, lo que definirá el signo de la microemulsión. De este modo, un emulgente con mayor afinidad por la fase acuosa será más soluble en agua que en aceite y dará lugar a microemulsiones de fase externa acuosa (O/A), mientras que un emulgente con mayor solubilidad en la fase oleosa originará microemulsiones de fase externa oleosa (A/O). Asimismo, en las microemulsiones también se pueden formar sistemas bicontinuos, en los que se identifican estructuras lamelares que se interponen entre ambas fases (Lawrence y Rees, 2012; Xavier-Junior et al., 2017).

Al igual que en un medio constituido únicamente por agua, la adición del emulgente a un sistema bifásico da lugar a la formación de diferentes estructuras como micelas esféricas, cilíndricas, así como estructuras hexagonales, lamelares y de tipo hexagonal (Figura 1.12). En caso de que la fase oleosa sea mayoritaria, se observan estructuras inversas, en las que la parte hidrófoba del emulgente queda expuesta hacia la fase continua oleosa (Birdi 2016). Cabe destacar que la concentración requerida de un emulgente dependerá de su naturaleza, del principio activo que se quiera formular y del signo de la microemulsión (Xavier-Junior et al., 2017).

En un sistema binario con una baja concentración de emulgentes se han detectado cuatro tipos de mezclas en equilibrio (Winsor, 1948):

- Tipo I, (O/A), en el que la fase continua es el agua, rica en emulgente, y la fase dispersa es el aceite.
- Tipo II, (A/O), en el que la fase continua es el componente oleoso, rico en emulgente, y la fase dispersa es la acuosa.
- Tipo III, en donde se establece una microemulsión de tipo bicontinuo, también llamada fase intermedia rica en emulgente, que coexiste con exceso de agua en la parte inferior y aceite en la superior.
- Tipo IV, en la que existe una sola fase, constituida por la microemulsión. En este tipo de formulación, el contenido en emulgente suele ser superior al 30% y puede ser a su vez de fase continua acuosa, oleosa, o bicontinua en función de la composición química cualitativa y cuantitativa.

La distribución de estos sistemas se suele representar gráficamente, en donde se observan los cambios en las fases según el contenido de emulgente y en función de otros factores que influyen en la capacidad tensoactiva del emulgente, como la temperatura. El punto X es punto tricrítico y se produce a una temperatura denominada temperatura de inversión de fase, que depende de la naturaleza de los componentes de la microemulsión y de su concentración (Birdi, 2016; Dhoot et al., 2018; Lawrence y Rees, 2012; Rakshit y Moulik, 2008) (Figura 1.13).

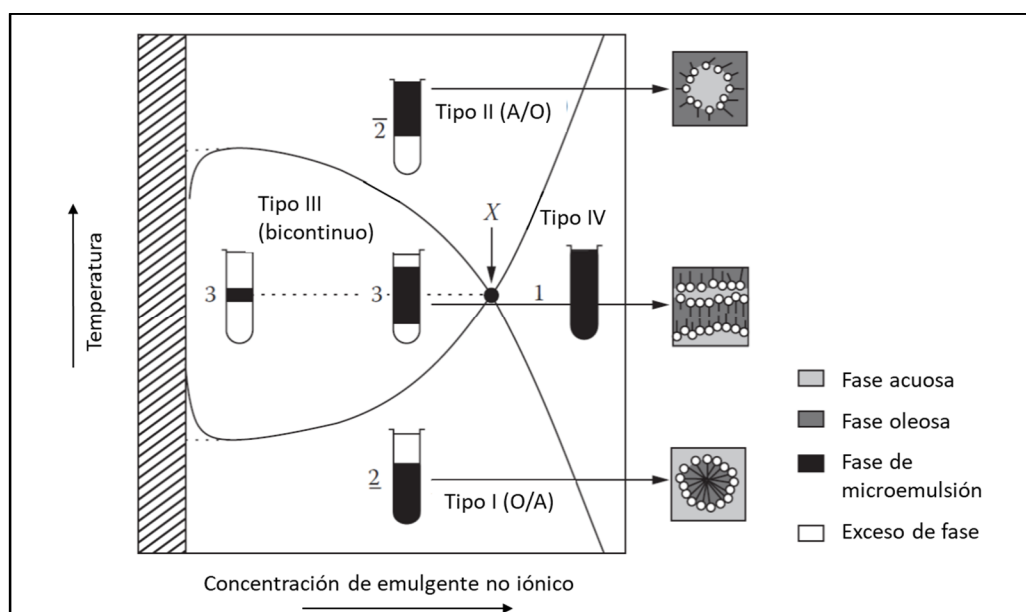


Figura 1.13. Sistemas de Winsor en función de la temperatura y de la concentración de tensoactivo del sistema. (Birdi 2016).

La composición de las microemulsiones se representa de forma global mediante un diagrama ternario, en los que cada eje representa uno de los componentes de la mezcla, cuyo contenido varía entre 0 y 100%. De este modo, cada punta del diagrama indica el máximo contenido de cada componente (100%). Si el sistema incluye una mezcla de emulgentes y coemulgentes, el diagrama se denomina pseudoternario, siendo uno de los ejes del diagrama una proporción determinada de emulgente y coemulgente. Cabe destacar que a bajas concentraciones de emulgente se encuentran los sistemas de Winsor comentados previamente (I, II, III y IV), mientras que a altas concentraciones de emulgentes se encuentra la estructura lamelar (Birdi, 2016; Lawrence y Rees, 2012; Rakshit y Moulik, 2008; Winsor, 1948; Xavier-Junior et al., 2017) (Figura 1.14).

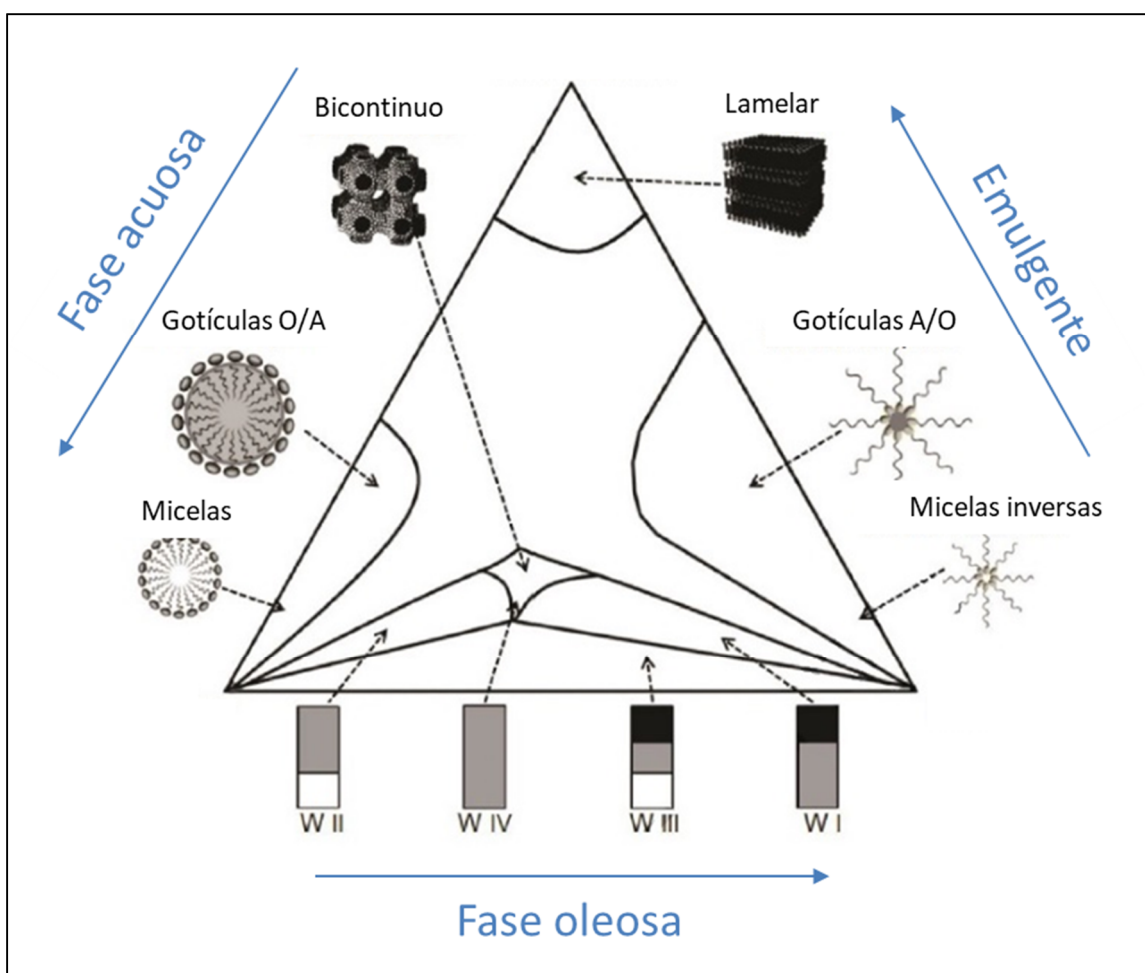


Figura 1.14. Esquema de las diferentes estructuras observadas en un diagrama ternario a una determinada temperatura. (Xavier-Junior et al., 2017).

Como se ha indicado anteriormente, la disponibilidad de los principios activos incluidos en microemulsiones aumenta debido a las bajas tensiones superficiales de estos sistemas (Birdi, 2016). Sin embargo, se ha observado que la estructura de las

microemulsiones influye en la biodisponibilidad de los fármacos formulados (Naoui et al., 2011; Peng et al., 2017; Subongkot y Ngawhirunpat, 2017). Naoui *et al.* desarrollaron microemulsiones tópicas de cafeína, como modelo de fármaco hidrofílico, con diferentes estructuras: O/A, bicontinua y A/O. Sus resultados mostraron que el flujo de permeación de la cafeína seguía el siguiente orden en las diferentes estructuras: A/O < bicontinua < O/A. Por tanto, la microemulsión de fase externa acuosa fue seleccionada ya que permitía la liberación del 50% de la dosis vehiculizada en 24 horas (Naoui et al., 2011). Por su parte, Subongkot *et al.* desarrollaron diferentes microemulsiones para mejorar la biodisponibilidad oral del ácido transretinoico. Seleccionaron una formulación bicontinua que permitía solubilizar la mayor cantidad posible de principio activo tanto en la fase oleosa como en la interfaz formada por el emulgente y el coemulgente, mejorando la disponibilidad del ácido transretinoico en el intestino delgado respecto de la formulación control (una solución de ácido transretinoico en aceite de pescado) (Subongkot y Ngawhirunpat, 2017). Por tanto, las microemulsiones son sistemas versátiles que permiten la formulación de principios activos de diferente naturaleza hidrófila y lipófila, mejorando su biodisponibilidad en diferentes vías de administración.

Selección de emulgentes

El comportamiento de los emulgentes se ha analizado mediante diferentes teorías empíricas. Éstas han demostrado ser de utilidad para seleccionar los emulgentes más adecuados en la formulación de nuevas microemulsiones. Se han definido 3 teorías:

- La teoría del equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB), desarrollada por Griffin, considera la contribución relativa de las partes hidrófila e hidrófoba de la molécula de emulgente. Una microemulsión A/O se forma gracias a la mayor afinidad del emulgente por la fase oleosa, que a una concentración adecuada, origina micelas inversas. Los emulgentes que permiten formar este tipo de microemulsiones presentan HLB de entre 3 y 8, mientras que las microemulsiones O/A requieren emulgentes con HLB de 8 a 18 (Griffin, 1954, 1949). En la formulación de aceites esenciales, este rango se debe acotar a un intervalo de HLB requerido por la fase oleosa, de entre 10 y 16 (Fernandes et al., 2013; Orafidiya y Oladimeji, 2002).

- El parámetro de empaquetamiento crítico (PEC) relaciona la geometría de la molécula del emulgente con el agregado que formarán las moléculas de emulgente con mayor probabilidad. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$PEC = v/a_0 \cdot l_c \quad (\text{Ec. 1}),$$

Siendo v el volumen molar parcial de la parte hidrófoba del emulgente; a_0 , el área óptima de la parte hidrofílica y l_c , la longitud crítica de la cadena hidrofóbica del emulgente. El efecto de la estructura de los emulgentes en el sistema se observa en la Figura 1.15. Los emulgentes con forma cónica originarán interfaces curvas, dando lugar a micelas, mientras que aquellos con forma rectangular formarán micelas alargadas o bien estructuras lamelares.

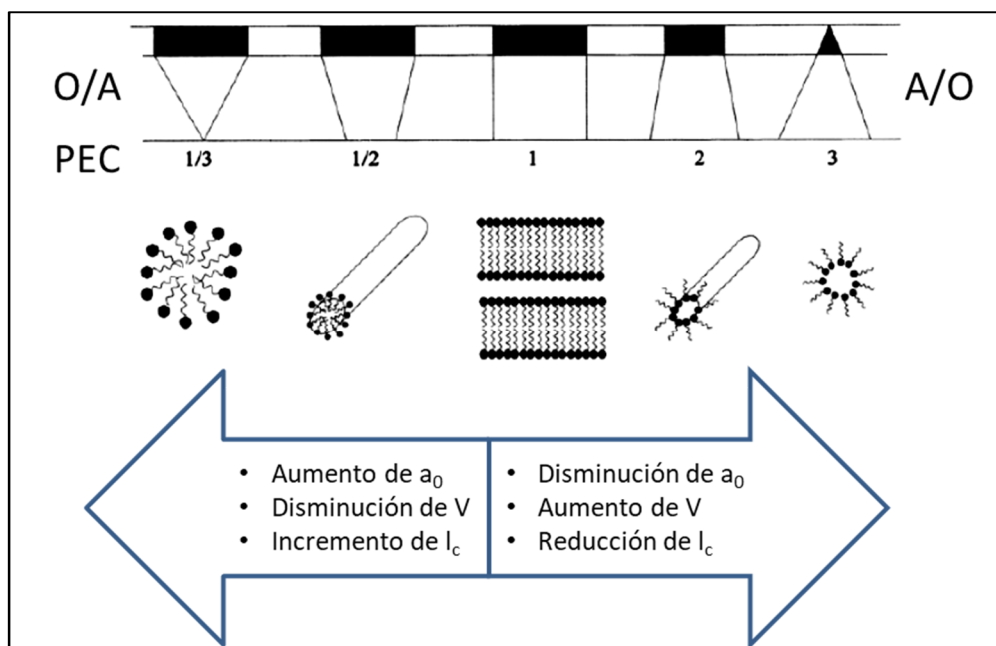


Figura 1.15. Efecto de la geometría del emulgente en el signo y en las estructuras del sistema. (Lawrence y Rees, 2012).

Cabe destacar que los cambios en la composición de la microemulsión también tienen un efecto en el PEC y, por tanto, en la estructura de la microemulsión ya que, si la fase oleosa contiene moléculas de tamaño pequeño, interaccionarán con las colas hidrofóbicas del emulgente, aumentando su volumen. Del mismo modo, la inclusión de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño incrementa el área óptima de la parte hidrofílica, alterando su solubilidad. En consecuencia, esta teoría también

muestra la necesidad de incorporar coemulgentes en la formulación de microemulsiones (Figura 1.11) (Lawrence y Rees, 2012; Xavier-Junior et al., 2017).

- La teoría del parámetro de solubilidad, basado en la teoría de Hildebrand, se define como el valor numérico que indica el comportamiento de un solvente específico en términos de solubilidad. Este parámetro se deriva de la energía de densidad cohesiva del solvente, procedente del calor de vaporización. La teoría de Hildebrand fue ampliada posteriormente por Hansen *et al.* para estimar la solubilidad relativa de los solventes polares. Consideraron que el parámetro de solubilidad está constituido por la interacción de 3 componentes: las fuerzas dipolares, los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de dispersión (Belmares et al., 2004; Hansen, 1969, 1967). De este modo, los solventes con parámetros de solubilidad similares son miscibles en la mayor parte de las proporciones, mientras que aquellos con parámetros diferentes presentan una solubilidad limitada (Belmares et al., 2004).

La teoría del parámetro de solubilidad es más completa que la teoría del HLB, ya que esta última no considera la compatibilidad química, es decir, la solubilidad del emulgente en las fases de la microemulsión. Sin embargo, el parámetro de solubilidad es un concepto complejo, definido por ecuaciones teóricas (Xavier-Junior et al., 2017).

1.3.1.3. Teorías sobre la formación de microemulsiones.

La formación de las microemulsiones ha sido abordada mediante 3 teorías principales (Lawrence y Rees, 2012):

Teoría de la interfaz

Fue desarrollada inicialmente por Schulman y Montagne considera que la película interfacial constituida por las moléculas del emulgente consta de una región que interacciona con la fase acuosa y la oleosa, generando tensiones independientes entre ambas superficies (Prince, 1977, 1967; Schulman y Montagne, 1961).

En base a esta teoría, la formación espontánea de una microemulsión requiere de una tensión interfacial negativa transitoria, que se produce durante el mezclado de los componentes del sistema, y que tiende a ser nula cuando el sistema alcanza el equilibrio (Prince, 1967). En este punto, en el sistema se ha producido la dispersión de los componentes, pero no la separación de los mismos (Prince, 1977, 1967; Schulman y Montagne, 1961).

Asimismo, los cambios en la dirección y la extensión de la curvatura se producen debido a interacciones entre las fases y la interfaz, que también condicionan el tamaño de las gotículas de la microemulsión (Adamson, 1969; Robbins, 1977).

Posteriormente, Rosano *et al.* indicaron que la difusión del coemulgente a través de la interfase y en ambas fases del sistema podía disminuir la tensión interfacial a cero, favoreciendo la dispersión espontánea de los componentes. Sin embargo, señalaron que cuando el sistema alcanza el equilibrio, la tensión interfacial tiene un valor bajo y positivo que permite la formación de una macro o microemulsión (Rosano y Clausse, 1987).

Teoría de solubilidad

Esta teoría indica que las microemulsiones están constituidas por micelas que solubilizan la fase acuosa o bien, la fase oleosa. Estas micelas se forman como consecuencia de la mezcla del emulgente con las dos fases inmiscibles acuosa y oleosa (Shinoda y Kunieda, 1973).

Teoría termodinámica

Se trata de la teoría más utilizada y sugiere que la energía libre de Gibbs asociada a la formación de la microemulsión consta de diferentes componentes: 1) la variación en la energía libre interfacial, 2) la energía libre de interacción entre las gotas y 3) la variación en la entropía del proceso de dispersión de las gotas de la microemulsión. Además, la interacción entre las gotas se debe a dos fuerzas principales: las interacciones de Van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostáticas, como consecuencia de la carga de la interfaz (Ruckenstein y Chi, 1975).

De acuerdo a esta teoría, la formación de una microemulsión puede ser descrito a partir de la siguiente ecuación (Ruckenstein y Chi, 1975):

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad (\text{Ec. 2})$$

Siendo ΔG_f la energía libre de la formación de la microemulsión; γ , la tensión interfacial en la interfaz de la fase acuosa y oleosa; ΔA , la variación en el área interfacial; ΔS , la variación en la entropía del sistema y T , la temperatura. Ruckestein *et al.* descubrieron que, en la formulación de emulsiones, ΔG_f es positivo, mientras que en la formación de microemulsiones, tiene un valor negativo o tendiente a cero (Ruckenstein y Chi, 1975) (Figura 1.16).

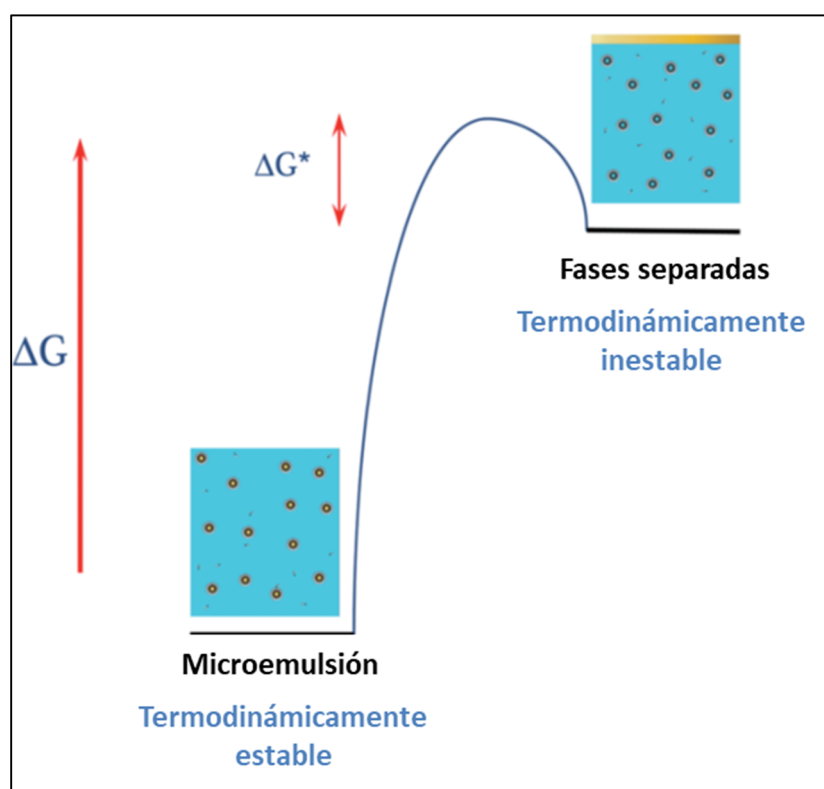


Figura 1.16. Diagrama de la variación en la energía libre durante la formación de una microemulsión. (McClements 2012).

Una energía libre de formación negativa se alcanza cuando se producen grandes reducciones en la tensión interfacial. Aunque las primeras investigaciones mostraron que se requería una tensión interfacial transitoria negativa, actualmente se considera que la tensión interfacial tiene un valor positivo y bajo ($\gamma < 10^{-2}$ mN/m), que está relacionada con la entropía del sistema (Prince, 1977, 1967; Schulman y Montagne, 1961). El incremento en la entropía del sistema se debe a la dispersión de una fase en la otra en forma de pequeñas gotas y a los procesos dinámicos de la difusión del emulgente dentro de la interfaz. Asimismo, se debe señalar que la formación de pequeñas gotas de una fase en otra genera un incremento en el área interfacial (ΔA) (Lawrence y Rees, 2012;

Ruckenstein y Chi, 1975). Por ello, la energía libre de formación de la microemulsión es inferior a las energías libres de cada fase inmiscible (Lawrence y Rees, 2000). La energía libre de formación negativa se consigue cuando las grandes reducciones en la entropía están acompañadas de cambios entrópicos significativos favorables. En tales casos, la emulsificación es espontánea y termodinámicamente estable (Lawrence y Rees, 2012; Ruckenstein y Chi, 1975).

1.3.1.4. Procedimientos de preparación de microemulsiones.

A pesar de las diferentes teorías relacionadas con la formación de microemulsiones en las que se demuestra que éstas no requieren aporte de energía durante su preparación, en la práctica es necesario incorporar cierta energía con el objetivo de romper las barreras de energía cinética y favorecer la difusión de moléculas del sistema (Lopes, 2014). Además, algunos factores como las variaciones en el orden de adición de los componentes, la aplicación de agitación mecánica o el uso de ultrasonidos pueden alterar el proceso de formación de las microemulsiones (Xavier-Junior et al., 2017).

En las últimas décadas, se han establecido dos métodos principales para la formación de microemulsiones:

Método de inversión de fases

Consiste en la modificación del sistema o de las condiciones del medio, lo que provoca el cambio en la curvatura de la interfaz, pasando desde una microemulsión A/O a O/A o viceversa. Desde un punto de vista práctico, estas modificaciones pueden ser de tres tipos (Muzaffar et al., 2013; Wang, 2014):

- La temperatura. El concepto de **temperatura de inversión de fases** (PIT) fue ideado por Shinoda y Arai y se define como la temperatura en la que el sistema cambia de signo como consecuencia de cambios en la geometría del emulgente y en su solubilidad (Shinoda, 1969). Este procedimiento se utiliza en la preparación de formulaciones constituidas por emulgentes no iónicos, que presentan mayor sensibilidad a los cambios de temperatura. El PIT está relacionado con el PEC ya que, a temperaturas inferiores al PIT, el PEC es inferior a 1, y el emulgente es más soluble en la fase acuosa, lo que da lugar a microemulsiones O/A. Sin embargo, a temperaturas superiores al PIT se

producen los efectos contrarios, dando lugar a microemulsiones A/O. En el PIT, el PEC es igual a 1, y el sistema está formado por estructuras lamelares (Lawrence y Rees, 2000).

- Las propiedades electroquímicas. Este método consiste en el cambio de la curvatura del sistema como consecuencia de cambios en el pH o en el contenido de sales, lo que modifica la fuerza iónica. Al igual que en el apartado anterior, se ha definido el **punto de inversión de la composición** (PIC) que está relacionado con el PEC. En este caso los emulgentes iónicos son sensibles a estas modificaciones del sistema, por lo que únicamente las formulaciones constituidas por estos tensoactivos pueden ser preparadas utilizando este procedimiento (Maestro et al., 2008; Rao y McClements, 2011).
- La composición. Este procedimiento no depende de las características del emulgente sino de la composición del sistema. El cambio en el volumen de las fases altera la curvatura de la interfaz, lo que modifica el signo de la microemulsión. De este modo, la incorporación de un exceso de fase acuosa a una microemulsión de tipo A/O provoca el cambio a una estructura O/A. Se define igualmente un **punto de inversión de la emulsión** (PIE), en el que se observa una estructura bicontinua (Fernandez et al., 2004; Rao y McClements, 2011). Sin embargo, cabe destacar que este método requiere emulgentes de pequeño tamaño molecular con solubilidades equivalentes en ambas fases del sistema, de manera que puedan dar lugar a microemulsiones O/A o A/O (Rao y McClements, 2011).

Método de valoración

Consiste en definir el volumen de dos de los componentes del sistema (fase acuosa, fase oleosa y emulgente), añadiendo cantidades conocidas del tercero. Si este tercer componente es la fase acuosa, la formulación pasará de ser una microemulsión de fase externa oleosa (A/O), a una microemulsión de fase externa acuosa (O/A), debido al cambio en la curvatura de la interfaz aceite-agua, de forma similar al método PIE (Djordjevic et al., 2004; Wang, 2014).

Varios autores han utilizado este procedimiento para la formulación de extractos esenciales en microemulsión. Hamed *et al.* desarrollaron microemulsiones a partir de una solución micelar formada por 5% p/p del emulgente Tween® 20 en agua desionizada, sobre las que se incorporó cantidades crecientes de una mezcla de eugenol y un extracto oleoso de clavo. Este procedimiento permitió obtener microemulsiones de fase externa acuosa, con una concentración de extracto vegetal de hasta 0,9% v/p (Hamed et al., 2012).

Por su parte, Okonogi y Chaiyana, desarrollaron microemulsiones de administración tópica a partir de un aceite esencial de *Z. cassumunar*, siguiendo un orden de mezclado diferente. En su estudio, el emulgente (Triton-X) y al menos uno de los diferentes coemulgentes (etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, alcohol cetílico, glicerina, propilenglicol o PEG 400) se mezclaron en una proporción 2:1 para obtener la mezcla de emulgentes. Ésta fue posteriormente mezclada con el extracto vegetal a diferentes proporciones, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 y 9:1, y se incorporó agua en agitación moderada hasta lograr la formación del sistema. El mayor área de microemulsión se registró en el diagrama de la mezcla formada por Triton-X y propilenglicol (2:1). Además, los resultados mostraron que los coemulgentes con cadenas alquílicas más cortas y menor número de grupos hidroxilo favorecían la formación de microemulsiones (Okonogi y Chaiyana, 2012) (Figura 1.17).

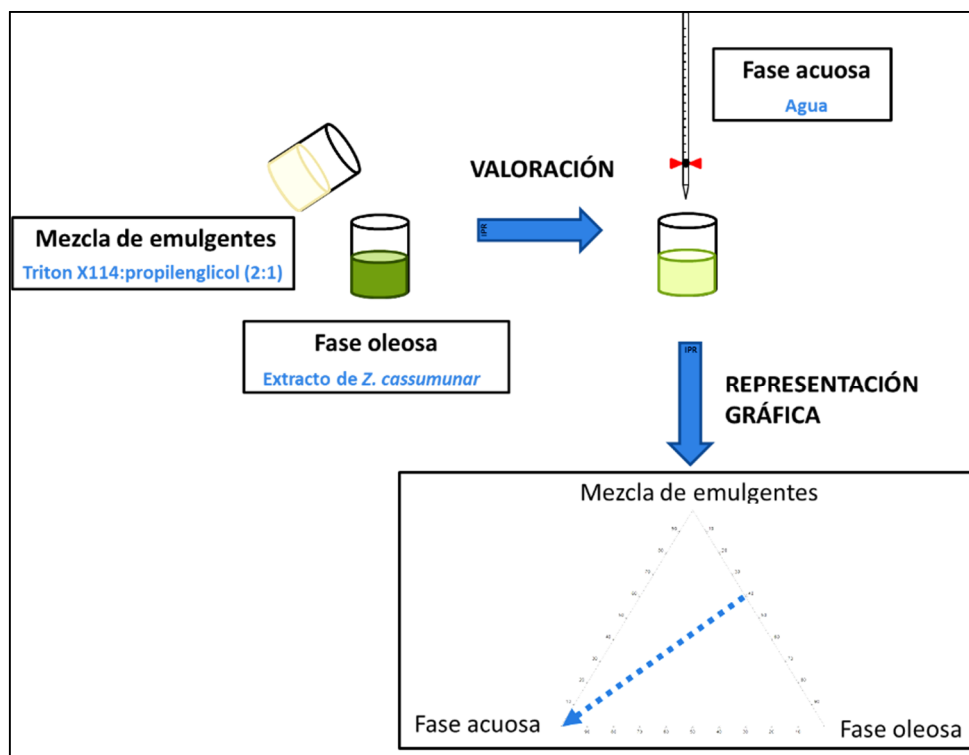


Figura 1.17. Esquema del método de valoración. (Okonogi y Chaiyana 2012).

La presentación de los resultados de la valoración en un diagrama ternario o pseudoternario (Figura 1.14 y Figura 1.17) permite definir la distribución de las diferentes estructuras del sistema, así como analizar las complejas interacciones entre los componentes.

1.3.1.5. Técnicas de caracterización de las microemulsiones.

La caracterización de las microemulsiones se ha convertido en un proceso clave en su desarrollo. El conocimiento de la estructura de una microemulsión permite conocer su capacidad para disolver y liberar los principios activos que incorpora (Rakshit y Moulik, 2008). El análisis de estas formulaciones es complejo, ya que requiere del uso de diferentes técnicas analíticas combinadas. Cada una de ellas aporta información que debe ser utilizada en combinación con el resto, para obtener un conocimiento completo de la disposición de las moléculas en el sistema (Boonme et al., 2006).

Observación directa

Constituye el primer método de caracterización utilizado por los investigadores, ya que permite diferenciar las microemulsiones y las estructuras de cristal líquido (transparentes) respecto de las emulsiones (turbias), y por tanto definir las principales áreas del diagrama ternario (Birdi 2016; Rakshit y Moulik 2008). La transparencia se debe al pequeño tamaño de gotícula, entre 10 y 100 nm, que no dispersa la luz visible en comparación con las gotas grandes presentes en una emulsión. En la Figura 1.18 se observan la apariencia de los diferentes sistemas de un sistema pseudoternario, formado por una fase oleosa, una mezcla de emulgentes y una fase acuosa. La microemulsión con cristales líquidos constituye un sistema intermedio en el que se presentan estructuras ordenadas de tipo hexagonal, cúbico y lamelar (Birdi 2016; Rakshit y Moulik 2008).

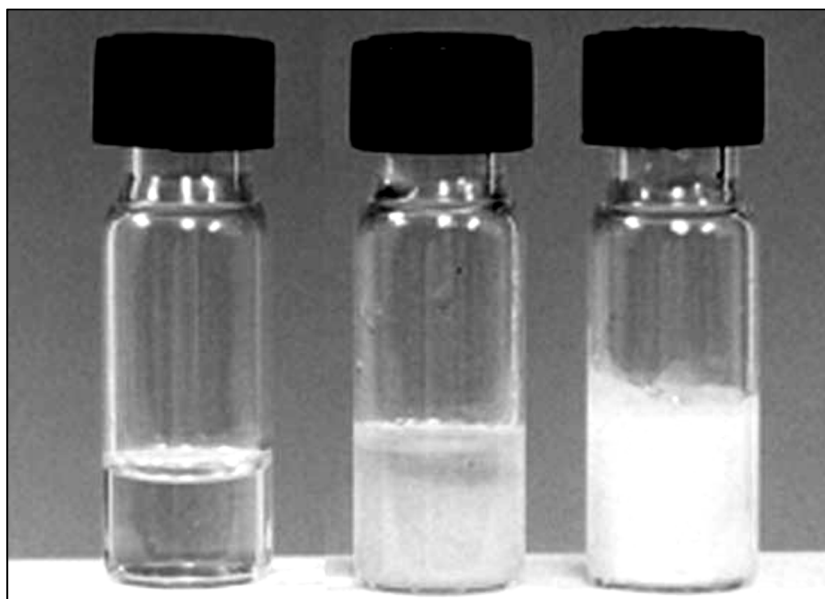


Figura 1.18. Apariencia de una microemulsión (izquierda) una microemulsión con cristales líquidos (centro) y una emulsión (derecha). (Rakshit y Moulik 2008).

Microscopía de luz polarizada

Las áreas del sistema ternario/pseudoternario establecidas por observación directa se pueden confirmar utilizando microscopía de luz polarizada, que permite diferenciar entre las microemulsiones y los cristales líquidos. Las primeras son sistemas isotrópicos, de forma que la luz atraviesa el material sin sufrir modificaciones. En cambio, los cristales líquidos son anisotrópicos (salvo las fases cúbicas) y sus propiedades ópticas varían con la orientación de la luz incidente (Djordjevic et al., 2004; Rakshit y Moulik, 2008).

Conductividad

La conductividad eléctrica es la capacidad de un material para transmitir la corriente eléctrica, y en los líquidos está relacionada con la presencia y el movimiento de los iones en solución. Se trata de una de las técnicas de caracterización de microemulsiones que permite conocer la naturaleza de la fase continua del sistema. En microemulsiones formadas por emulgentes no iónicos, generalmente la fase acuosa es el principal portador de iones al sistema y por tanto, las microemulsiones O/A tienen una conductividad mayor que las microemulsiones A/O (Birdi, 2016; Djordjevic et al., 2004; Kumar et al., 2016).

Varios estudios han analizado la relación entre la conductividad y el cambio en la estructura desde una microemulsión O/A a A/O debido a un cambio en la composición

del sistema, con la adición de fase acuosa. Laguës y Sauterey y Mehta y Bala describieron las siguientes fases a lo largo de una línea de dilución (Lagues y Sauterey, 1980; Mehta y Bala, 2000; Rakshit y Moulik, 2008):

1. Las microemulsiones A/O con bajo contenido en agua (<10% p/p), presentan conductividades inferiores a 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
2. El aumento del contenido acuoso del sistema incrementa la conductividad, debido a la fusión de las gotículas en el seno de la fase oleosa, dando lugar a la formación de canales acuosos transitorios que favorecen el movimiento de los iones. Este proceso se denomina percolación y tiene lugar a concentraciones críticas de fase acuosa de entre 10 - 26% p/p, dependiendo de la composición de la microemulsión, del tipo de coemulgente y de la temperatura.
3. Al alcanzar concentraciones del 40 – 45% p/p de fase acuosa, se forman sistemas bicontínuos, en los que la conductividad es intermedia entre el valor obtenido en la microemulsión A/O y la O/A.
4. Un posterior incremento del contenido acuoso, hasta concentraciones del 60% p/p, dan lugar a la inversión de fases desde el sistema bicontínuo para formar una microemulsión O/A. Este cambio en la estructura del sistema se refleja en un incremento rápido de la conductividad.
5. A concentraciones elevadas de fase acuosa (>60% p/p), la conductividad puede mantenerse o disminuir, debido a la dilución del sistema.

La conductividad es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de microemulsiones, debido a su simplicidad, fácil interpretación de sus resultados y bajo coste de los equipos. Las medidas de conductividad permiten conocer el comportamiento del sistema y sus cambios estructurales al modificar su composición, así como determinar el umbral de percolación (Rakshit y Moulik, 2008). En este sentido, Zargar *et al.* utilizaron esta técnica para determinar el punto de inversión desde una microemulsión A/O a una estructura bicontínua o microemulsión O/A. Para ello, analizaron la conductividad de una línea de dilución en un sistema formado por Cremophor® EL e Imwitor® 308 (7:3 p/p), como emulgente y coemulgentes respectivamente, y miristato de

isopropilo como fase oleosa en una proporción (1:1 p/p). Representaron sus resultados mediante una gráfica conductividad (σ) *versus* contenido en agua (ϕ) (Figura 1.19A). A partir de este gráfico calcularon la ecuación que presentaba un mejor ajuste, y estimaron posteriormente su derivada ($d\sigma/d\phi$), determinando un valor máximo al 23% p/p de agua. Este resultado indica la concentración de agua que da lugar a un cambio en la estructura en el sistema (Figura 1.19B) (Zargar-Shoshtari et al., 2010).

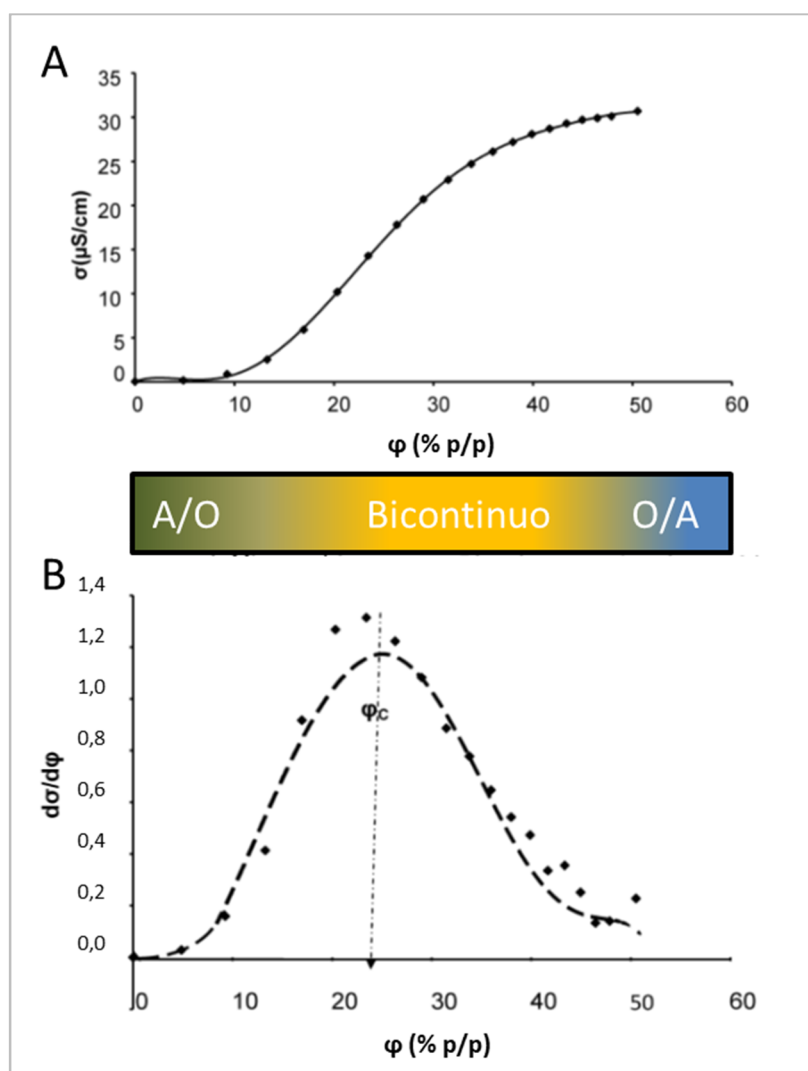


Figura 1.19. Variación en la conductividad según el contenido en agua (A) y derivada de la conductividad en función del contenido en agua (B). (Zargar-Shoshtari et al., 2010).

Esta metodología les permitió comparar formulaciones de diferente composición. De este modo, los sistemas formados por Cremophor[®] EL y Imwitor[®] 308 presentaron máximos con un contenido de agua diferente, en función de la proporción de emulgente y coemulgente (7:3 o 5:5). Por otro lado, la estructura química del emulgente y del coemulgente también puede retrasar los cambios en la estructura del sistema, debido a las

interacciones de las moléculas de agua con los emulgentes. Estas variaciones según el tipo de emulgente y su contenido en agua hasta alcanzar la inversión de una microemulsión A/O a una estructura bicontinua o microemulsión O/A se observan en la Tabla 1.2 (Zargar-Shoshtari et al., 2010).

Tabla 1.2. Mezcla de emulgente y coemulgente y su contenido en agua. (Zargar-Shoshtari et al., 2010).

Emulgente	Coemulgente	Proporción	Cantidad de agua
Cremophor® EL	Imwitor® 308	7:3	23% p/p
	Imwitor® 308	5:5	31% p/p
Tween® 85	Imwitor® 308/ Transcutol® P (1,0:1,25 p/p)	6,4:3,6	21% p/p
	Imwitor® 308/ Transcutol® P (1,0:1,25 p/p)	8:2	25% p/p

Viscosidad

Las propiedades de flujo de un sistema coloidal dependen de su estructura y están determinadas por la disposición y las interacciones de sus componentes (Rakshit y Moulik, 2008). La viscosidad se define como la resistencia de un líquido a fluir tras aplicar una fuerza de cizalla. Las diferencias en el comportamiento de los líquidos ante esta deformación permite clasificarlos en newtonianos y no newtonianos. Los primeros siguen la ley de Newton (Nielloud y Marti-Mestres, 2010):

$$\tau = \gamma' \mu \quad (\text{Ec. 3}),$$

en donde τ es la fuerza de cizalla por unidad de tiempo y área, γ' es la velocidad de deformación y μ es la viscosidad. En fluidos homogéneos y bajo peso molecular, en los que existe una relación lineal entre la variación en la fuerza de cizalla y la velocidad de deformación, la viscosidad varía únicamente con la temperatura. En cambio, la deformación de los líquidos no newtonianos no se debe únicamente a la viscosidad, sino a otros factores como la velocidad y el tiempo de deformación o al procedimiento de medida (Nielloud y Marti-Mestres, 2010).

Los estudios reológicos muestran que a diferencia de las emulsiones y de las estructuras de cristal líquido, las microemulsiones siguen un comportamiento newtoniano en un amplio rango de velocidades de cizalla (Peyrelasse et al., 1988). Las microemulsiones A/O y O/A presentan una viscosidad similar a la de sus respectivas fases

continuas. Sin embargo, las estructuras intermedias, con la fusión de las gotículas de agua y la formación de canales acuosos, muestran una mayor viscosidad (Rakshit y Moulik, 2008; Yuan et al., 2015).

Al igual que la conductividad, las propiedades reológicas permiten analizar los cambios en la estructura del sistema en una línea de dilución, debido a las modificaciones en la capa de emulgente y en el contenido de las fases acuosa y oleosa (Djordjevic et al., 2004; Zargar-Shoshtari et al., 2010). Un estudio realizado por Yuan *et al.* comparó los cambios en la viscosidad y la conductividad durante la valoración de un sistema formado por una mezcla de emulgentes (emulgente Solutol HS-15 y una mezcla de etanol y polietilenglicol 400 como coemulgentes) y fase oleosa (triglicéridos del ácido caprílico y cáprico) en una proporción 8:2. Sus resultados mostraron un máximo en la viscosidad al incorporar 40% p/p de fase acuosa, asociado a un aumento de la conductividad. Los autores concluyeron que al incorporar al menos 40% p/p de fase acuosa, es posible formar una estructura bicontinua o una microemulsión O/A (Figura 1.20) (Yuan et al., 2015).

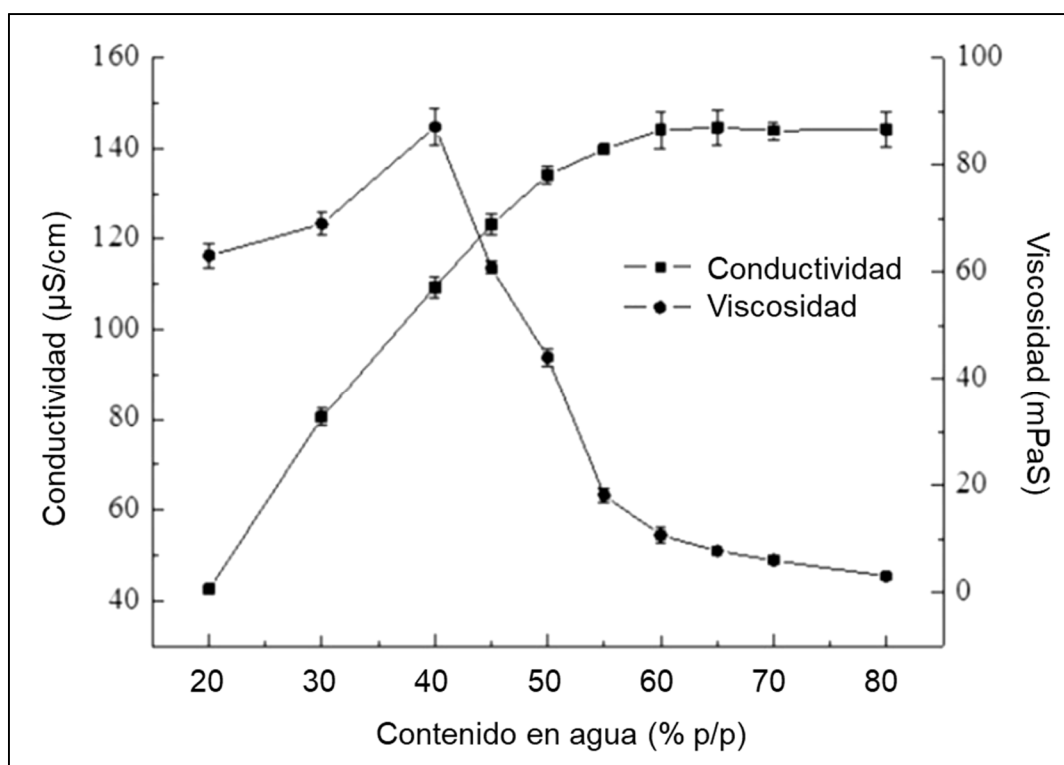


Figura 1.20. Cambios en la viscosidad y en la conductividad de una microemulsión de ciclosporina A según el contenido en agua. (Yuan *et al.* 2015).

Asimismo, en el estudio realizado por Zargar *et al.*, el máximo en la derivada de la conductividad, al incorporar un 23% p/p de agua (Figura 1.19B), se corresponde con

un máximo en la viscosidad, que confirma el cambio en la estructura del sistema, de una microemulsión A/O a una estructura bicontinua o una microemulsión O/A (Zargar-Shoshtari et al., 2010).

Calorimetría de barrido diferencial

Esta técnica se clasifica entre los métodos de análisis térmico y permite conocer el comportamiento de una muestra en función de la temperatura. Ha sido recientemente incorporada al estudio de microemulsiones y permite analizar la fase continua del sistema. Asimismo, la congelación y la fusión del agua como componente de la microemulsión puede aportar información sobre la estructura del sistema, diferenciando entre las moléculas de agua libre y las asociadas a la interfaz (Rakshit y Moulik, 2008).

Tamaño de gotícula y estructura del sistema: técnicas de dispersión de la luz.

La estructura de una microemulsión se puede analizar mediante *pulsed-field gradient self-diffusion NMR*. Esta técnica se basa en las propiedades físicas del spin molecular y permite analizar la difusión de pequeñas moléculas, según la estructura del sistema. A pesar de que el uso de esta técnica aporta datos exactos y precisos de todos los componentes de la muestra simultáneamente en un solo conjunto de medidas, la interpretación de los resultados es compleja (Rakshit y Moulik, 2008).

Las estructuras internas de la microemulsión se pueden analizar mediante técnicas de microscopía electrónica, como la *freeze fracture transmission electron microscopy* (FF-TEM) y la *cryo field emission scanning and transmission electron microscopy* (cryo-FESEM y cryo-TEM). Al observar un sistema coloidal con microscopía electrónica, se debe solidificar la muestra del líquido a estado sólido, lo que constituye un procedimiento invasivo, que puede alterar la microestructura de la microemulsión. Sin embargo, los recientes avances en las técnicas de criopreparación para microscopía electrónica han probado ser muy útiles en el estudio de microemulsiones, ya que permiten visualizar sus estructuras sin alteraciones, mediante procesos de congelación rápidos (Boonme et al., 2006; Rakshit y Moulik, 2008).

La caracterización de las microemulsiones también se realiza mediante la distribución de los tamaños de gotícula del sistema, utilizando técnicas de dispersión. Las gotículas se encuentran en los sistemas que forman microemulsiones de tipo A/O u O/A,

mientras que en las estructuras de Winsor tipo III y IV (bicontinuas) no será posible detectarlas (Wang y Pal, 2016). Debido a que las microemulsiones son sistemas complejos, las interacciones entre las gotículas dificultan su análisis, por lo que algunos investigadores diluyen las muestras antes de medir el tamaño de gotícula. Sin embargo, esta metodología presenta limitaciones, ya que la dilución del sistema modifica su composición y en consecuencia, su estructura.

En general, las técnicas de dispersión permiten conocer el tamaño de gotícula debido a que una mayor intensidad de la radiación dispersada está asociada a la presencia de áreas de mayor densidad electrónica, que están relacionadas a su vez con la presencia de agregados de moléculas de emulgente (Rakshit y Moulik, 2008). Las técnicas de dispersión de radiación pueden estar basadas en dispersión de rayos x, como la *small angle x-ray scattering* (SAXS) en la dispersión de neutrones, como la *small angle neutron scattering* (SANS) o bien, en la dispersión de la luz.

De entre las técnicas de dispersión de la luz, destaca la dispersión dinámica (en inglés, *dynamic light scattering-DLS*), que aporta información sobre la distribución de tamaños de las gotículas de entre 0,3 nm y 10 μm , analizando su movimiento browniano. La técnica DLS, basada en la teoría de Mie, es más sensible a los cambios estructurales que otras técnicas de dispersión, y no perturba las estructuras del sistema (Birdi, 2016; Boonme et al., 2006; Rakshit y Moulik, 2008). El movimiento browniano se produce debido al bombardeo aleatorio de las moléculas de solvente. Las partículas pequeñas son más susceptibles y por tanto, se mueven con mayor rapidez, mientras que las partículas grandes se desplazan más lentamente. El movimiento browniano hace que la luz láser se disperse con diferente intensidad, y el análisis de estas fluctuaciones permite conocer el tamaño de las partículas (Berne y Pecora, 2000; Schmitz y Phillies, 1991).

Los equipos DLS se componen de un láser generalmente de He-Ne, que constituye la fuente de luz para iluminar la muestra contenida en la celda. En muestras diluidas, la mayor parte del láser atraviesa la muestra, pero parte puede ser dispersada por las partículas. La luz difractada es recogida por un sistema de lentes y dirigida a una batería de detectores concéntricos. Las señales de intensidad son analizadas posteriormente por un equipo de procesamiento digital que compara la intensidad de la luz dispersada a intervalos de tiempo sucesivos para estimar la tasa de variación de dicha intensidad. Si las partículas son grandes, la señal cambiará lentamente y la correlación persistirá durante

un largo periodo de tiempo, mientras que, si las partículas son pequeñas, la correlación se reducirá más rápidamente. Además, cuanto más pronunciada es la caída de la correlación, menor será la dispersión de tamaño de partículas de la muestra (Berne y Pecora, 2000; Schmitz y Phillies, 1991) (Figura 1.21).

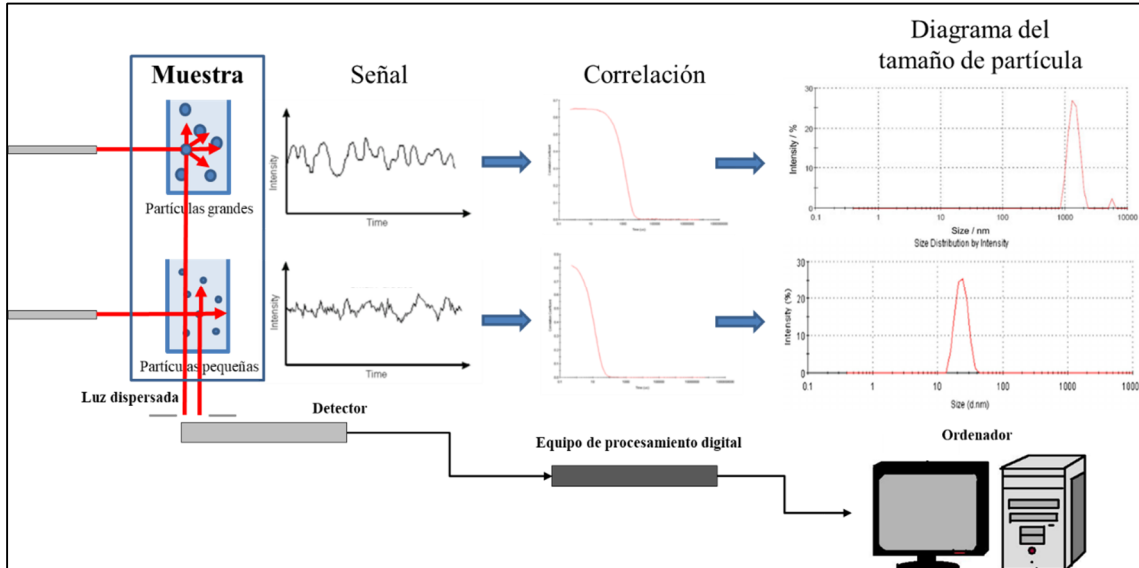


Figura 1.21. Disposición de los componentes de un equipo de DLS y análisis de partículas. (Martínez Carmona, 2016).

La velocidad del movimiento browniano se define por el coeficiente de difusión traslacional (D). El tamaño de una partícula se calcula a partir de su coeficiente de difusión utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (Berne y Pecora, 2000):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Ec. 4}),$$

Siendo $d(H)$ el diámetro hidrodinámico de la partícula; k , la constante de Boltzman; T , la temperatura y η , la viscosidad. Cabe destacar que el diámetro que se obtiene a partir de esta técnica es el diámetro de una esfera con el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula. El coeficiente de difusión traslacional depende no solo del tamaño de la partícula, sino de las características de la superficie, así como de la concentración y el tipo de iones del medio (Berne y Pecora, 2000; Schmitz y Phillies, 1991).

En una dispersión, las partículas presentan un movimiento aleatorio, el movimiento Browniano, que provoca que la intensidad de la luz dispersada varía en función del tiempo. El correlador estima la función de correlación a partir de la intensidad

de la luz dispersada. En muestras con un elevado número de partículas monodispersas, la función de correlación (G) es una función de disminución exponencial de la demora del tiempo de correlación (τ) (Skoog et al., 2007):

$$G(\tau)=A[1+B\cdot e^{(-2\Gamma\tau)}] \quad (\text{Ec. 5}),$$

En donde A es el punto de referencia de la función de correlación y B , la ordenada en el origen de la función de correlación (Skoog et al., 2007).

$$\Gamma=D\cdot q^2 \quad (\text{Ec. 6}),$$

En donde D es el coeficiente de difusión traslacional, y q está definido por:

$$q=(4\pi n/\lambda_0)\cdot \text{sen}(\theta/2) \quad (\text{Ec. 7}),$$

En donde n es el índice de refracción de la fase externa, λ_0 es la longitud de onda del láser y θ es el ángulo de dispersión (Skoog et al., 2007).

En muestras polidispersas, la ecuación de correlación sigue la siguiente estructura:

$$G(\tau)=A [1+B\cdot g_1(\tau)^2] \quad (\text{Ec. 8}),$$

En donde $g_1(\tau)^2$ constituye la suma de todas las disminuciones de la función de correlación (Skoog et al., 2007).

La función de correlación permite estimar el tamaño mediante una sola ecuación exponencial o bien, múltiples ecuaciones exponenciales para obtener el tamaño medio (Z-average). Finalmente, se obtiene un gráfico de la intensidad relativa de la luz dispersada en diferentes intervalos de tamaño, que se conoce como distribución de intensidad, y que puede transformarse en gráficos de volumen y de número de partículas (Berne y Pecora, 2000; Schmitz y Phillies, 1991).

1.3.2. Las microemulsiones como formulaciones intermedias: métodos de solidificación.

Las microemulsiones son formulaciones líquidas con una elevada estabilidad, que permiten solubilizar fármacos hidrofóbicos, favoreciendo su biodisponibilidad por vía oral. Para facilitar su dosificación, estos sistemas se incluyen habitualmente en cápsulas. Sin embargo, los componentes de la formulación lipídica, especialmente aquellos con

pequeño peso molecular, pueden interactuar con diversos componentes de la cubierta del sistema como la gelatina, poniendo en riesgo la estabilidad de la microemulsión y disminuyendo la eficacia de la formulación final (Choudhari et al., 2014b; Pouton y Porter, 2008). Por ello, en los últimos años, se han desarrollado diferentes sistemas de solidificación, como las dispersiones sólidas amorfas, que mejoran la dosificación y la biodisponibilidad oral de las formulaciones lipídicas.

1.3.2.1. Dispersiones sólidas

Este término se refiere a la dispersión de uno o más principios activos en un portador inerte o matriz en estado sólido (Chiou y Riegelman, 1971), que puede ser a su vez ser formulada en comprimidos o en cápsulas duras de gelatina (Gumaste et al., 2013b; Hentzschel et al., 2011).

Por tanto, las formulaciones líquidas con interés farmacéutico pueden ser incorporadas a portadores sólidos, con una elevada área superficial y una alta capacidad de adsorción, dando lugar a mezclas pulverulentas. Las características principales de un portador sólido ideal son las siguientes (Choudhari et al., 2014b):

- elevada capacidad de adsorción y desorción,
- buenas propiedades de flujo, incluso tras la incorporación de la mezcla oleosa,
- facilidad para ser incorporado a otras formulaciones sólidas y
- alta compatibilidad con el material adsorbido.

Entre los productos con capacidad adsorbente destacan los derivados de celulosa, de sílice, e isomaltosa. Sin embargo, los derivados de sílice presentan una gran área superficial y una elevada biocompatibilidad para la administración de formulaciones terapéuticas, por lo que han sido ampliamente utilizados en el campo farmacéutico (Beg et al., 2016; Choudhari et al., 2014b; Gumaste et al., 2013b).

Los materiales mesoporosos de sílice están formados por una estructura tridimensional formada por tetraedros de SiO_4 interconectados. Presentan poros esféricos o cilíndricos, con un tamaño medio de entre 2 y 50 nm (Subcommittee on Characterization of Porous Solids, 1994), que les permite una capacidad de absorción de entre el 10 y el 60% p/p (Gumaste et al., 2013a; Madhav y Kishan, 2017).

La superficie interna de los materiales mesoporosos de sílice presenta grupos silanoles con diferentes concentraciones, que establecen puentes de hidrógeno con los fármacos polares e interacciones electrostáticas o hidrofóbicas con el fármaco o la formulación lipídica cargada. La liberación de estos componentes depende de varios factores, como el área superficial, el tamaño y el volumen de los poros, la concentración de grupos silanoles por área, etc. (Figura 1.22) (Choudhari et al., 2014a).

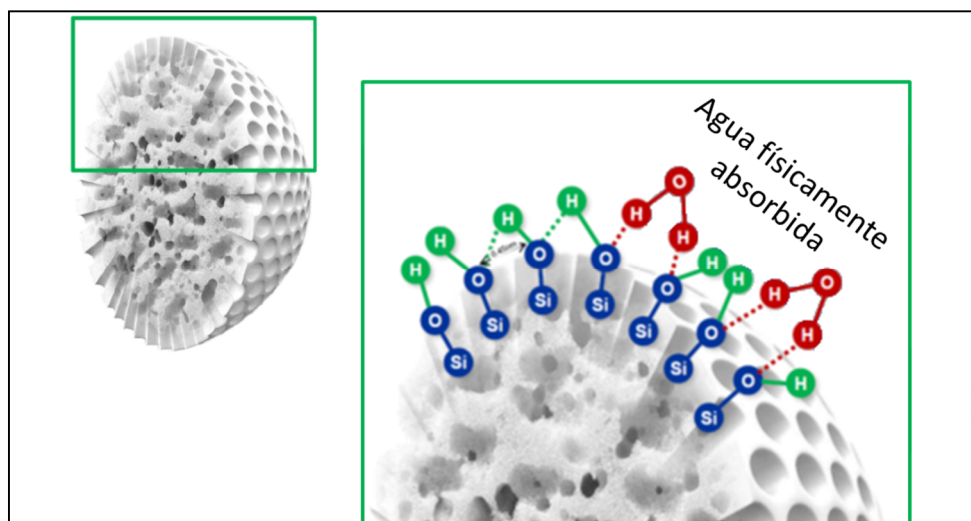


Figura 1.22. Estructura de silicagel mesoporoso (Syloid® XDP). (Grace 2015).

Debido a su proceso de fabricación, los materiales de sílice mesoporosos se clasifican principalmente en sistemas (Choudhari et al., 2014a):

- ordenados. Se fabrican por medio de plantillas que permiten formar estructuras ordenadas. Posteriormente, estas plantillas se eliminan de la estructura de sílice. Estos materiales presentan poros ordenados, según su orientación y tamaño.
- no ordenados o amorfos. Se fabrican a nivel industrial, por medio de un proceso solgel, seguidos de una reacción de precipitación, dando lugar a la formación de poros interconectados, con diferentes orientaciones.

Ambos grupos de materiales de sílice están siendo ampliamente utilizados en el campo farmacéutico. Sin embargo, los materiales no ordenados presentan mayores ventajas a nivel industrial, ya que se pueden producir de manera sencilla a nivel industrial, lo que reduce su coste de fabricación (Choudhari et al., 2014a).

Un estudio llevado a cabo por Choudhari *et al.* comparó las características y las propiedades de absorción y de desorción de diferentes silicatos no ordenados: silicagel

mesoporoso (Syloid® XDP), sílice pirogénica granulada (Aeroperl® 300Pharma) y aluminosilicato magnésico (Neusilin® US2). Sus resultados mostraron que a pesar de presentar un tamaño medio de partícula similar a Syloid® XDP (150 µm), el Neusilin® US2 presenta un volumen medio de poro superior al resto de productos evaluados, lo que le aporta una mayor capacidad de absorción (308 – 391 g/100 g de polvo). Sin embargo, Neusilin® US2 presentó una baja capacidad de desorción del aceite cargado (vitamina E) (Tabla 1.3). Algunos de los factores que pueden explicar este efecto son un alto volumen de poro y la formación de puentes de hidrógeno con el aceite cargado, que pueden dar lugar a un efecto de *cuello de botella* (Choudhari et al., 2014b; Kutza et al., 2013). Respecto a Syloid® XDP, su capacidad de absorción fue ligeramente superior a la registrada por Aeroperl® 300Pharma. Sin embargo, ambos materiales mostraron una capacidad de desorción similar del aceite cargado (85%) (Tabla 1.3) (Choudhari et al., 2014b). Otra de las pruebas para comparar estos materiales consistió en someterlos durante cuatro días a una humedad relativa del 90% y comparar, a continuación, su capacidad de absorción del aceite. La humedad puede reducir la capacidad de absorción de los materiales de sílice mesoporosos, al interaccionar con los grupos silanoles y reducir los grupos silanoles disponibles (Choudhari et al., 2014a). Los resultados mostraron que Neusilin® US2 presentó una mayor sensibilidad a la humedad, ya que su capacidad de absorción del aceite se redujo un 7,43%, mientras que este parámetro fue del 2,47% y del 5,79% para Syloid® XDP y Aeroperl® 300Pharma, respectivamente (Tabla 1.3) (Choudhari et al., 2014b).

En cuanto a sus propiedades de flujo, analizadas en función del ángulo de reposo, el índice de compresibilidad y el índice de Hausner, ninguno de los materiales analizados mostró diferencias entre el estado vacío y cargado con el aceite en proporción 1:1,5 (Choudhari et al., 2014b). Asimismo, todos los materiales cargados con el aceite en proporción 1:1,5 mostraron unas propiedades de flujo buenas o excelentes, según la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Características y propiedades de 3 derivados de sílice utilizados en la absorción de formulaciones lipídicas. (Choudhari, Reddy, et al. 2014).

Propiedades	Silicagel mesoporoso (Syloid® XDP 3150)	Sílice pirogénica granulada (Aeroperl® 300Pharma)	Aluminosilicato magnésico (Neusilin® US2)
Características del polvo			
Tamaño de partícula (µm)	150	60	150
Volumen del poro (mm ³ /g)	2200	2200	4000
Área superficial (m ² /g)	320	300	300
Propiedades de absorción			
Volumen máximo de aceite cargado (g/100 g de polvo)	285 - 373	266 – 360	308 - 391
Cantidad de aceite liberado del material sólido (% p/p)	85	85	38
Reducción de la absorción por el efecto de la humedad (4 días a 90% humedad relativa) (%)	2,47	5,79	7,43
Propiedades de flujo del polvo cargado con vitamina E (1:1,5 p/p)			
Densidad aparente (g/mL)	0,57	0,33	0,50
Densidad compactada (g/mL)	0,71	0,41	0,61
Ángulo de reposo (°)	34,20	34,29	37,28
Índice de compresibilidad (%)	19,71	19,51	18,03
Índice de Hausner	1,24	1,24	1,22

Por ello, debido a sus propiedades físicas, de flujo y a su capacidad de absorción, se observa que el silicagel mesoporoso es más adecuado para ser utilizado en la formulación de dispersiones sólidas respecto de la sílice pirogénica granulada y el aluminosilicato magnésico (Choudhari *et al.* 2014). Además, la forma comercializada de silicagel mesoporoso (Syloid® XDP) contiene grupos silanoles en el interior de los poros que favorecen la liberación progresiva y controlada de las formulaciones lipídicas (Figura 1.22) (Choudhari et al., 2014b).

Métodos para la incorporación de la formulación farmacéutica.

En los años 70, las dispersiones sólidas se fabricaban mediante técnicas de fusión, uso de solventes o una combinación de ambos procedimientos (Chiou y Riegelman, 1971). En los últimos años, se han desarrollado otras técnicas para la incorporación de principios activos en matrices sólidas (Limnell, 2011). A continuación, se indican los aspectos principales:

- Métodos de fusión. Consisten en calentar el principio activo por encima de su punto de fusión. Los materiales sólidos portadores pueden ponerse en contacto con el principio activo fundido o bien, fundirse y mezclarse con el principio activo, seguido de una fase de enfriamiento. Aunque existen diferentes variantes de este procedimiento, ninguno de ellos es adecuado para la formulación de principios activos termolábiles como los aceites esenciales.
- Métodos basados en el uso de solventes. Consisten en la disolución del principio activo, poniendo en contacto la disolución con el material de sílice. Posteriormente, el exceso de solvente se evapora utilizando diferentes procedimientos, utilizando un rotavapor o con métodos más sofisticados como spray-drying, liofilización o fluidos supercríticos.
- Otros métodos. Algunos de ellos consisten en incorporar el fármaco a materiales sólidos mesoporosos moliendo conjuntamente el principio activo con el sólido portador o bien, dispersar el principio activo en la dispersión coloidal de silicatos (sol) seguido del proceso de gelificación, dando lugar a la síntesis del material de sílice ya cargado con el fármaco (proceso sol-gel).

El método de impregnación es una variante de los métodos basados en solventes. Se basa en preparar una solución saturada del fármaco, que en contacto con el material de sílice mesoporoso, penetra en los poros por capilaridad. Este procedimiento ha sido utilizado en la solidificación de formulaciones lipídicas, tales como las microemulsiones o los sistemas auto-microemulsionables (SMEDDS)⁴ (Choudhari et al., 2014a).

Un estudio realizado por Alinaghi *et al.* comparó la eficiencia de la incorporación de un SMEDDS en sílice pirogénica (Aerosil® 380) utilizando un método de impregnación o bien, un método de evaporación de solvente por *spray-drying*. El SMEDDS estaba formado por danazol, una antigonadotropina indicada en el tratamiento de endometriosis y angioedema hereditario, perteneciente a la clase II BCS, disuelto en una mezcla constituida por una fase oleosa, un emulgente y un coemulgente (Capmul®

⁴ Un sistema automicroemulsionable, denominado en inglés *self-microemulsifying drug delivery system* (SMEDDS), es una mezcla isotrópica anhidra formada por una fase oleosa, un emulgente y un coemulgente capaz de formar una microemulsión en medio líquido (Chatterjee et al., 2016).

MCM: Tween[®] 80: Transcutol[®] HP) en proporciones 1:2:1. Una parte del SMEDDS fue incorporado al material de sílice en una proporción 2:1 utilizando una espátula y formando un polvo fluido. Por otro lado, el SMEDDS fue disuelto en agua destilada para formar una microemulsión, que fue posteriormente cargada en el material de sílice. El disolvente se evaporó utilizando un procedimiento de secado por atomización. Los resultados mostraron una eficiencia en la carga del fármaco y del sistema lipídico del 88 y del 100%, respectivamente (Alinaghi et al., 2015). Por tanto, se concluye que la impregnación es un método sencillo, que permite alcanzar una eficiencia adecuada para la obtención de dispersiones sólidas amorfas (Alinaghi et al., 2015). Además, este procedimiento no requiere la exposición de la formulación a altas temperaturas para la eliminación del solvente, de manera que constituye un método apto para la solidificación de formulaciones basadas en extractos naturales (Choudhari et al., 2014a; Deshmukh y Kulkarni, 2014; Turek y Stintzing, 2013).

Uno de los factores que condiciona la incorporación de las moléculas de fármaco en el material de sílice es el tamaño de poro. Las moléculas que componen la formulación lipídica se pueden adsorber disponiéndose en monocapa o multicapa, según su interacción con la superficie de la sílice. Si la adsorción se produce en una monocapa, la cantidad de formulación cargada será directamente proporcional a su área superficial, mientras que si la formulación se incorpora a una proporción elevada respecto del material de sílice, las moléculas de la primera se dispondrán en multicapas, y su adsorción será proporcional al volumen del poro y al área superficial (Choudhari et al., 2014a).

1.3.2.2. Caracterización de dispersión sólida amorfa

Las dispersiones sólidas amorfas se pueden analizar en función del tamaño de partícula y su morfología, mediante técnicas de dispersión láser y de microscopía electrónica (Choudhari et al., 2014a). Asimismo, las propiedades de flujo de la formulación sólida son de interés para su posterior formulación en comprimidos, determinándose mediante el ángulo de reposo y la densidad aparente y la densidad compactada, que permiten calcular el índice de compresibilidad y el índice de Hausner. El procedimiento para la realización de estas determinaciones, así como la interpretación de sus resultados, se indica en las principales farmacopeas, RFE-EP (Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea), JP (Farmacopea Japonesa) o USP (Farmacopea de los Estados Unidos).

La formulación cargada en el material de sílice se puede cuantificar exponiendo el polvo a un medio líquido adecuado, que permita la liberación de la formulación. También es posible incorporar una sustancia marcadora a la formulación. La determinación del fármaco incluido en la formulación líquida o bien, de una sustancia marcadora, permitirá conocer la eficiencia de método de impregnación, la cantidad de fármaco incorporado a la formulación sólida final y la cinética de liberación (Choudhari et al., 2014a). Entre los modelos utilizados para racionalizar el proceso de liberación se encuentran los indicados en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Cinéticas de liberación. (Costa y Sousa Lobo, 2001).

Nombre	Expresión	Parámetros	Descripción
Cinética de orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0(t - t_l)$	K_0 (masa / tiempo)	Se utiliza en formas farmacéuticas que liberan la misma cantidad de principio activo por unidad de tiempo. Se trata de formas farmacéuticas de liberación modificada y matrices que contienen principios activos poco solubles en agua, formas recubiertas, sistemas osmóticos, etc.
Cinética de primer orden	$Q_t = Q_0 e^{-K_1(t-t_l)}$ $\ln(Q_\infty - Q_t) = \ln Q_\infty - K_1 t$	K_1 (tiempo ⁻¹)	El principio activo se libera proporcionalmente a la cantidad del interior. Se observa en formas farmacéuticas que contienen principios activos hidrosolubles en matrices porosas.
Cinética de Weibull	$\frac{W_d}{W_0} = 1 - e^{\left(\frac{-(t-T_d)^\beta}{a}\right)}$ $a = (T_d)^\beta$	W_d (masa); W_0 (masa); a (tiempo); β^*	Se ajusta a la mayoría de las curvas de disolución obtenidas experimentalmente.
Modelo simplificado de Higuchi	$Q_t = K_H(\sqrt{t} - \sqrt{t_l})$ $Q_t = Q_i + K_H\sqrt{t}$	K_H : constante de Higuchi (masa/longitud ² /t ^{1/2})	Las expresiones matemáticas se obtienen considerando que las partículas dispersadas en una matriz uniforme que se comporta como un medio de difusión. Se utiliza en el análisis de sistemas de liberación modificada. La liberación de principios activos de una matriz semisólida y/o sólida.
Modelo de Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{(Q_\infty - Q_t)} = \sqrt[3]{Q_\infty} - K(t - t_l)$	K (masa ^{1/3} /tiempo)	Asume que la tasa de liberación está limitada por la tasa de disolución de las partículas. Se utiliza para el análisis de comprimidos, en los que la disolución se produce en planos paralelos a la superficie del principio activo, de forma que la forma geométrica se mantiene constante.

Nota: *Sin unidades.

1.3.2.3. Formulación de una dispersión sólida amorfa en comprimidos.

En general, no es posible comprimir directamente la dispersión sólida, por lo que se podría recurrir a técnicas de granulación para mejorar las propiedades de flujo y compactación de la mezcla pulverulenta como paso previo a la compresión, o bien recurrir a excipientes especiales que permitan la compresión directa. La granulación puede llevarse a cabo vía seca o vía húmeda. La modalidad más utilizada en estos sistemas es la granulación húmeda, si bien este método requiere agregar cierta cantidad de humedad para generar los granulados, lo que podría provocar la salida del fármaco embebido debido al exceso de humectación de la superficie de la sílice (Choudhari et al., 2014a; Vialpando et al., 2012).

Por su parte, para poder llevar a cabo la compresión directa, la mezcla pulverulenta debe tener propiedades adecuadas de flujo y compresión, para obtener comprimidos con uniformidad de contenido y características físicas adecuadas (Mangal et al., 2015; Martinello et al., 2006; Mirani et al., 2011; Rojas et al., 2013; Swarbrick, 2007). Debido al carácter cristalino de los polvos de silicatos, los comprimidos formados por los materiales de sílice cargados tienen malas propiedades de compresibilidad. Asimismo, suelen presentar tiempos elevados de disgregación, como consecuencia de su naturaleza hidrofóbica, asociada a la presencia de componentes lipídicos (Gumaste et al., 2013a). Por ello, el desarrollo de comprimidos a partir de materiales cargados de sílice mesoporoso requiere de aglutinantes, con comportamiento plástico, para mejorar las propiedades de compresibilidad. Además, Vialpando *et al.* mostraron que fuerzas de compresión elevadas pueden provocar la salida del líquido absorbido por expresión fuera de la sílice mesoporosa y por tanto, se deben aplicar menores fuerzas de compresión, incorporando plastificantes y aglutinantes (Choudhari et al., 2014b; Vialpando et al., 2011).

Los aglutinantes son excipientes que establecen conexiones entre las partículas del polvo incrementando la fuerza tensil de los compactados durante la compresión. Algunos de los aglutinantes comúnmente utilizados son la celulosa microcristalina (20-90% p/p) y el almidón gelatinizado (10 – 25% p/p) (Rowe, 2009; Swarbrick, 2007). Mattsson y Nyström evaluaron diferentes aglutinantes secos para establecer las propiedades más relevantes en la compactación de mezclas pulverulentas. Sus resultados demostraron que la polivinilpirrolidona (PVP) presenta una mayor capacidad de

deformación y de ocupación de los poros en la mezcla comprimida, respecto a otros aglutinantes como la celulosa microcristalina o el almidón pregelatinizado. Por tanto, las mezclas pulverulentas formadas por 21,5% p/p de PVP y comprimidas a 200 MPa presentaron mayores fuerzas tensiles axial y radial⁵ que las mezclas con celulosa microcristalina y almidón pregelatinizado, a la misma concentración (Mattsson y Nyström, 2001). Estos resultados indican que la PVP puede mejorar la fuerza tensil de los comprimidos formados por materiales de sílice (Vialpando et al., 2011).

Por su parte, los disgregantes se incluyen en la formulación para promover la ruptura de los comprimidos, incrementando el área superficial y facilitando la liberación del principio activo. Los disgregantes más utilizados son la celulosa microcristalina (5 - 15% p/p) y el almidón pregelatinizado (10 – 25% p/p) (Swarbrick, 2007). Una variante de los disgregantes clásicos son los superdesintegrantes, que se incluyen a concentraciones no superiores al 10% p/p debido a su elevada eficacia. Algunos de ellos son la croscarmelosa sódica (Ac-Di-Sol®) o el almidón glicolato sódico (Primojel®, Explotab®) (Rowe, 2009; Swarbrick, 2007).

Otros excipientes necesarios en la fabricación de comprimidos son aquellos que reducen la fricción entre las partículas de polvo y que, por tanto, favorecen las propiedades de flujo de la mezcla pulverulenta, tales como la sílice coloidal (Aerosil®). Asimismo, se incluyen lubricantes, agentes que evitan la adherencia de las partículas de polvo al punzón y a la matriz de la máquina de comprimir. Entre los lubricantes más eficaces se encuentra el talco y el estearato magnésico (Swarbrick, 2007).

Choudhari *et al.* desarrollaron una formulación de comprimidos mediante compresión directa, utilizando Syloid® XDP cargado con vitamina E (1:1) (Tabla 1.5). La fuerza de compresión fue de 20 kN, para dar lugar a comprimidos con propiedades físicas adecuadas (dureza: 60 N, fuerza tensil≈1,6 MPa y tiempo de desintegración: 1 min) (Chen et al., 2016; Choudhari et al., 2014b). Sin embargo, en base a las publicaciones anteriores, se considera que es posible incorporar otros aglutinantes, como

⁵ La fuerza tensil radial permite determinar la dureza del comprimido aplicando una fuerza perpendicular al diámetro de la base del cilindro, mientras que la fuerza tensil axial consiste en la aplicación de una fuerza en la misma dirección que la fuerza de compresión previamente aplicada (Mattsson and Nyström, 2001).

povidona y superdisgregantes, como la croscarmelosa, que pueden mejorar las propiedades de compresión del material de sílice.

Tabla 1.5. Composición de una formulación en comprimidos. (Choudhari, Reddy, et al. 2014).

Componente	Contenido (% p/p)	Función
Syloid [®] XDP: vitamina E (1:1 p/p)	40,0	Material de sílice cargado
Celulosa cristalina (MCC PH102)	45,5	Aglutinante
Almidón pregelatinizado	10,0	Aglutinante
Croscarmelosa (Ac-Di-Sol [®])	3,0	Superdisgregante
Syloid [®] 244FP	1,0	Favorecedor de flujo
Estearato magnésico	0,5	Lubricante

1.3.2.4. Caracterización de comprimidos: compactación y compresión

Los comprimidos son formas farmacéuticas sólidas obtenidas preferentemente mediante uno o varios procesos de compresión. Durante la fabricación de comprimidos, se producen dos procesos simultáneamente: la compactación y la compresión.

Compactación: resistencia a la fractura

Se refiere al aumento de la fuerza mecánica debido a la formación de uniones entre las partículas del polvo. Este proceso se relaciona con la friabilidad y la resistencia a la fractura de los comprimidos. El análisis de friabilidad determina el daño en la superficie del comprimido al someterlo a fuerzas abrasivas. Por tanto, este ensayo permite conocer hasta qué punto el comprimido es frágil y por tanto, si resiste lo suficiente para su embalaje, transporte y dispensación. En cambio, la medida de la resistencia a la fractura aporta un conocimiento más amplio de la compactabilidad del comprimido. El método tradicional de determinación de la resistencia a la fractura de comprimidos consiste en determinar la fuerza tensil (Chen et al., 2016). El equipo más comúnmente utilizado para la determinación de la fuerza tensil es el aparato de Schleuniger, en donde el comprimido se dispone entre dos mandíbulas metálicas. Una de las mandíbulas se mantiene estática, mientras la otra se desplaza aplicando una fuerza diametral, capaz de provocar la ruptura del comprimido (Figura 1.23).

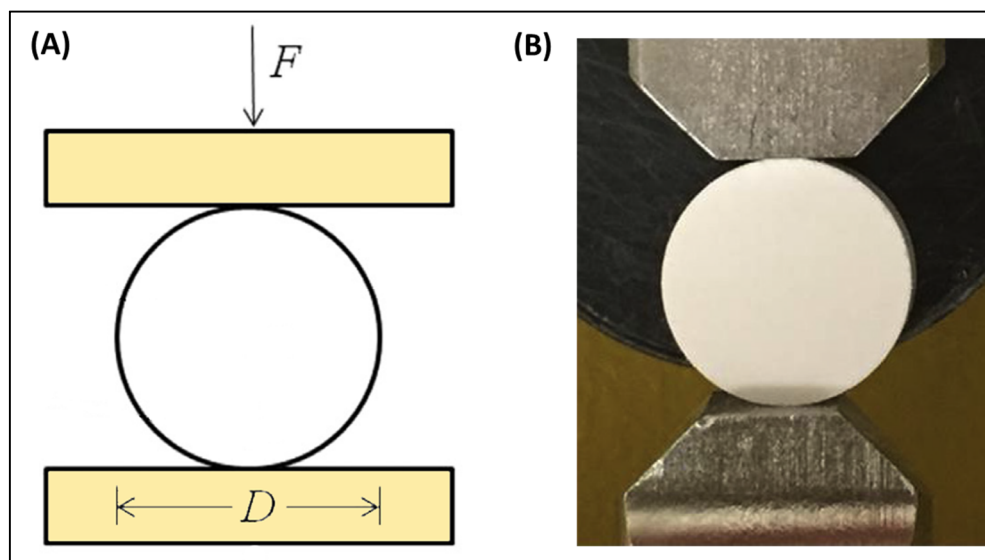


Figura 1.23. Esquema (A) y aspecto real (B) del sistema de medida de la fuerza de fractura del comprimido. (Hilden et al., 2017).

Esta fuerza es monitorizada por el equipo, que determinará la fuerza de fractura, generalmente expresada en newton (Swarbrick, 2007). La fuerza de fractura permite calcular la fuerza tensil del comprimido utilizando la fórmula de Fell y Newton (Fell y Newton, 1970):

$$\sigma = \frac{2F}{\pi DH} \quad (\text{Ec. 9})$$

en donde σ es la fuerza tensil, F es la fuerza de fractura, D es el diámetro del comprimido y H es la altura del comprimido. Los valores de fuerza tensil deseables son superiores a 1 MPa, aunque el rango se encuentre entre 0,1 y 4 MPa (Chen et al., 2016).

Compresión: tiempo de desintegración

Se define como una reducción en el volumen aparente del polvo tras aplicar una fuerza, lo que provoca una disminución en la porosidad de la mezcla. Por tanto, la porosidad, el tamaño y la distribución de los poros del comprimido afectan a su desintegración y al tiempo de disolución (Chen et al., 2016).

El test de desintegración permite conocer la rapidez de un comprimido para desintegrarse en agregados o partículas. Se asume que, si un comprimido se degrada en un corto periodo de tiempo (< 15 minutos), el fármaco será liberado de la forma farmacéutica, estando disponible para su absorción en el tracto intestinal sin que ésta condicione su biodisponibilidad. Este ensayo se encuentra convenientemente descrito en

las principales farmacopeas y habitualmente se considera un ensayo complementario al de disolución (Swarbrick, 2007).

El test se realiza en un equipo de desintegración, que consta de 6 tubos, con base de rejilla de dimensiones tipificadas, en donde se depositan los comprimidos, que se mantienen en posición con un disco. El montaje canastilla-gradilla se cuelga de un brazo oscilante, que permitirá que el sistema tenga un movimiento vertical en el medio de ataque que se mantiene a 37 ± 2 °C. El tiempo necesario para la disgregación de cada comprimido, se registra para comprobar que cumple la especificación requerida (Figura 1.24) (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013; Swarbrick, 2007).

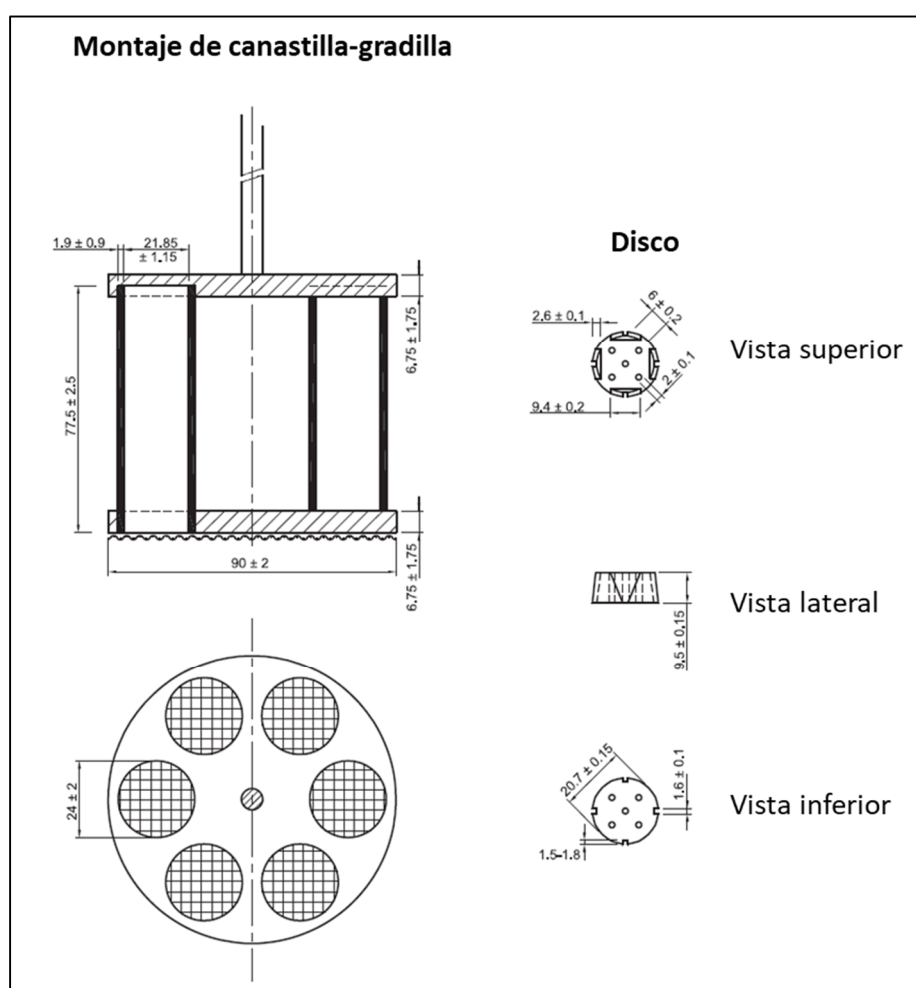


Figura 1.24. Estructura del equipo de desintegración (medidas expresadas en mm).
(Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013).

1.4. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS: METODOLOGÍA SUPERFICIE-RESPUESTA.

El desarrollo de formulaciones farmacéuticas con propiedades adecuadas para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de los principios activos es un proceso complejo. A menudo, estas investigaciones se basan en metodologías de prueba y error, que consumen tiempo y recursos, y requieren la realización de múltiples experimentos (Buruk Sahin et al., 2016).

Además, durante el diseño de formulaciones dirigidas a la vehiculización de productos naturales, a menudo no se dispone de los recursos suficientes para el desarrollo y la repetición de los experimentos de forma que se alcancen conclusiones fiables. Por tanto, en las últimas décadas se ha recurrido al uso de técnicas estadísticas que reducen el tiempo y las materias primas de escasa disponibilidad, como los aceites esenciales, cuya producción a menudo presenta un rendimiento escaso, con un nivel de incertidumbre aceptable para el investigador (Myers et al., 2016).

1.4.1. Definición

La metodología superficie-respuesta es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que permiten el desarrollo, la mejora y la optimización de procesos. Su aplicación más relevante se refiere al mundo de la industria, especialmente cuando variables de entrada o independientes tienen una influencia potencial en una variable respuesta continua que condiciona la calidad de un producto o proceso. La metodología superficie respuesta está constituida por las siguientes etapas (Myers et al., 2016):

1. Diseño de experimentos para analizar el área de estudio o experimental definida por las variables independientes,
2. Modelización estadística de los datos empíricos, para desarrollar una relación aproximada entre las variables independientes y la variable respuesta,
3. Métodos de optimización para encontrar los niveles o los valores de las variables independientes que producen los valores deseables de la variable respuesta.

1.4.2. Diseños de mezclas

Los diseños de mezclas constituyen una modalidad de la metodología superficie-respuesta, en la que los factores o las variables independientes son los componentes de la mezcla y la variable respuesta es una propiedad de la mezcla determinada por la composición del sistema. El objetivo de los diseños de mezclas consiste en encontrar la mejor proporción de cada componente de la mezcla para optimizar una o varias variables respuesta de forma simultánea (NIST/SEMATECH, 2012).

Debido a que las formulaciones farmacéuticas son mezclas de principios activos y excipientes, esta metodología se ha utilizado en la formulación de microemulsiones (Cao et al., 2017; Lin et al., 2017), SMEDDS (Dalvadi et al., 2017; Valicherla et al., 2016), liposomas (Ćurić et al., 2013) y comprimidos (Bolourtchian et al., 2010; Malakar et al., 2012; Martinello et al., 2006; Mohamad Zen et al., 2015; Tibalinda et al., 2016), siendo especialmente útil para la formulación de sustancias activas con malas propiedades de flujo y compactación (Bolourtchian et al., 2010; Malakar et al., 2012; Maltais et al., 2015; Martinello et al., 2006; Mohamad Zen et al., 2015), sin embargo, todavía no han sido utilizados para desarrollar comprimidos de compresión directa a partir de materiales de sílice cargados con una formulación líquida.

1.4.2.1. Definición del área experimental

Debido a que las proporciones de todos los componentes en una mezcla deben sumar la unidad, cualquier alteración en la proporción de un componente provoca cambios en al menos otro componente. Por tanto, las variables independientes en el diseño de mezclas son, en realidad, dependientes entre sí, ya que la proporción de un componente condiciona el contenido de los componentes restantes. Además, la proporción de los componentes debe ser cero o positiva. Considerando que la mezcla está formada por q componentes i , la proporción de cada componente se expresa como x_i , de forma que la suma de las proporciones de cada componente debe sumar 1 (Armstrong, 2006; Myers et al., 2016):

$$x_i \geq 0; i = 1, 2, 3, \dots, q; \sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (\text{Ec. 10})$$

El área experimental de un diseño de mezclas, es decir, la zona que representa todas las posibles combinaciones de los componentes, puede representarse como el interior y los límites de una figura regular formada por q vértices en $q-1$ dimensiones, denominada *simplex*. Si el sistema está formado por 3 componentes, la región

experimental se dispone en un triángulo, siendo los vértices los puntos correspondientes a los componentes puros, de forma similar a un diagrama ternario. De este modo, en la formulación de microemulsiones se pueden incluir 3 componentes: la mezcla de emulgentes, la fase oleosa y la fase acuosa (Myers et al., 2016) (Figura 1.25).

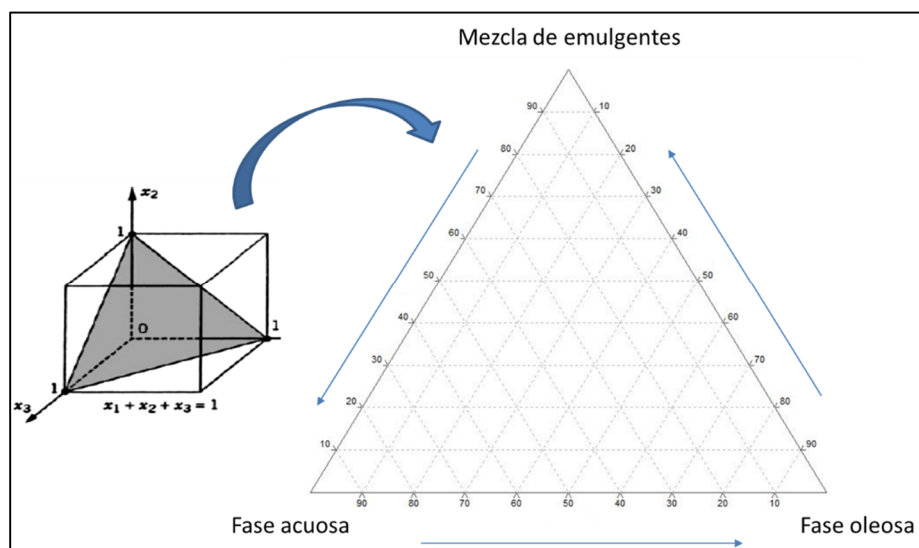


Figura 1.25. Región experimental de un diseño de mezclas de 3 componentes y su diagrama ternario. (Myers et al., 2016).

No toda el área experimental presenta formulaciones factibles ya que, si uno de los componentes es el principio activo, éste estará incluido en las formulaciones en un determinado rango de concentración, de acuerdo a su dosis. A menudo, este rango vendrá condicionado por la solubilidad del principio activo en los excipientes de la formulación. De este modo, se debe definir una zona dentro del área experimental, y redefinir la composición del sistema en términos de *pseudocomponentes*. Si se establece un límite inferior en la composición de todos los componentes, la forma triangular del área experimental se mantendrá (Figura 1.26), mientras que si se aplica un límite superior o inferior y superior, el área experimental tendrá una forma diferente y generalmente, irregular (Armstrong, 2006; Myers et al., 2016).

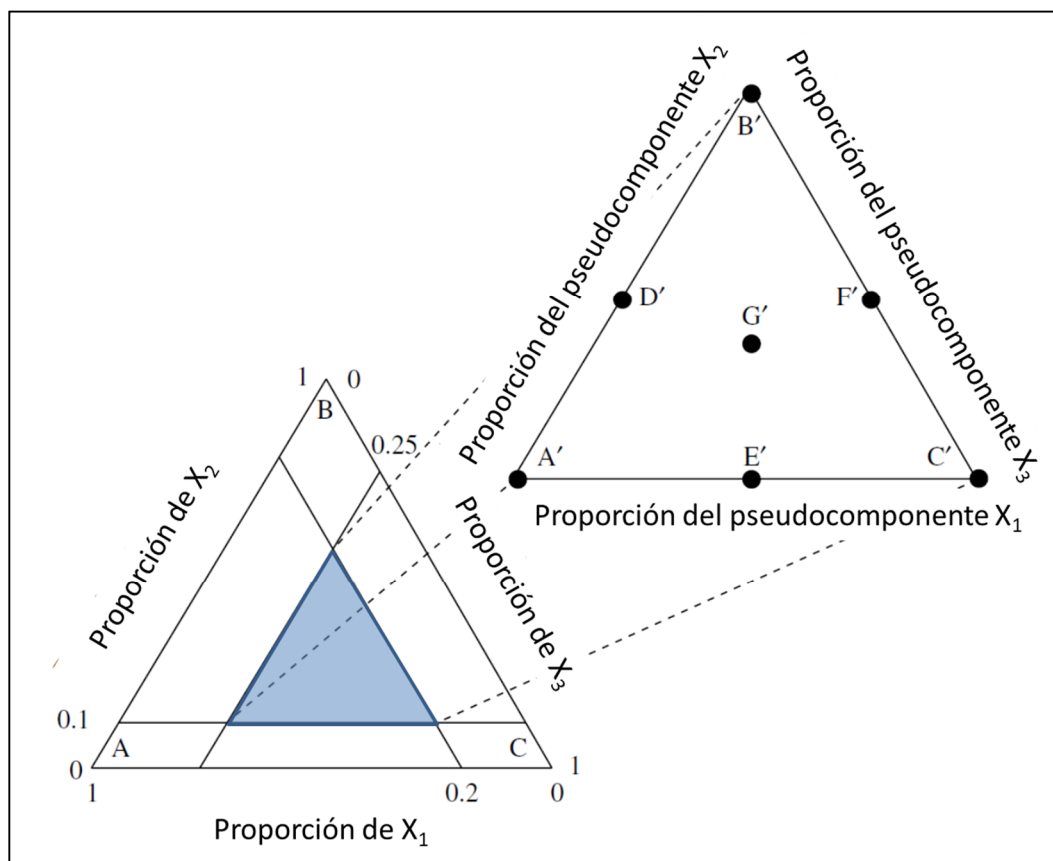


Figura 1.26. Área experimental global y delimitada por el contenido de los pseudocomponentes X_1 , X_2 y X_3 . (Armstrong, 2006).

1.4.3. Modelización

1.4.3.1. Diseño experimental.

El diseño experimental es un proceso eficiente para plantear experimentos de forma que los datos empíricos obtenidos puedan ser analizados y permitan llegar a conclusiones válidas y objetivas (NIST/SEMATECH, 2012). Para ello, el área experimental se debe cubrir con el suficiente número de experimentos que permitan cuantificar la relación entre las variables dependientes e independientes. Estos experimentos se seleccionan en función del diseño experimental, que debe ser designado en función del objetivo del estudio y del número de experimentos que se puedan desarrollar. El objetivo del estudio puede consistir en seleccionar los componentes de la mezcla con mayor repercusión en la variable dependiente (cribado) o bien, en el análisis de la influencia de la respuesta de cada componente independiente y/o en combinación con otros, lo que permite la predicción del valor de la respuesta de una mezcla o combinación de componentes. El número de experimentos depende a su vez del número

de factores y sus niveles, así como de la complejidad de la relación entre las variables. No obstante, el número de experimentos suele ser limitado, debido a las condiciones de coste, tiempo o a la disponibilidad de los materiales (Lewis et al., 1998; NIST/SEMATECH, 2012).

En un área experimental regular simplex, se suelen utilizar diseños estándar como *Simplex Lattice* o *Simplex Centroid*. Los diseños *Simplex Lattice* se suelen utilizar para describir la superficie-respuesta. Un diseño (q, m) está formado por q componentes en el que las fracciones de los componentes toman valores $m+1$ espaciados equitativamente entre 0 y 1. El número de experimentos es $(q+m-1)!/[(m!)(q-1)!]$. De este modo, se consigue una distribución ordenada de 6 experimentos para un *Simplex Lattice* (3,2), 10 experimentos si es (3,3), etc. Como se observa en la Figura 1.27, la mayor parte de los experimentos se localizan en el perímetro del área de estudio, de forma que apenas se obtiene información relativa al centro del área experimental (NIST/SEMATECH, 2012; Reliasoft, 2015).

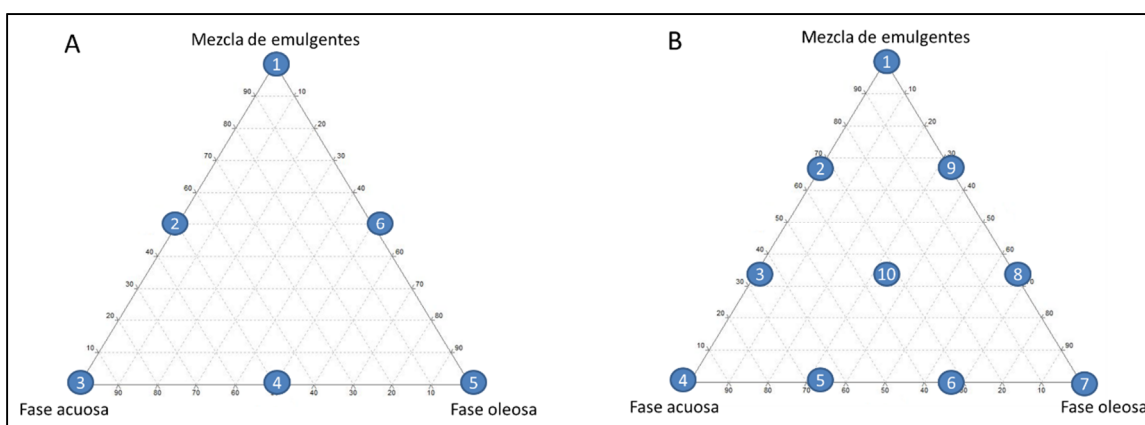


Figura 1.27. Diseño de experimentos *Simplex Lattice* (3,2) (A) y (3,3) (B). (Reliasoft, 2015).

En cambio, el diseño *Simplex Centroid* se suele utilizar en los procesos de cribado, y considera los puntos centrales de los ejes, de forma que en un diseño de q componentes, se plantean $2^q - 1$ experimentos. El grado del diseño, definido como m ($m < q$), implica que el número total de experimentos sea $\binom{q}{1} + \binom{q}{2} + \dots + \binom{q}{m}$ (Figura 1.28) (Reliasoft, 2015).

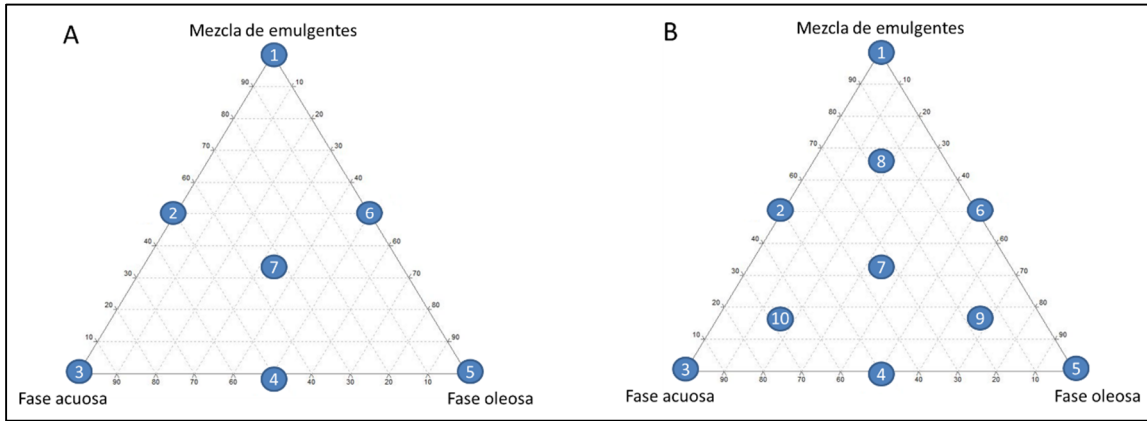


Figura 1.28. Diseño de experimentos *Simplex Centroid* (3,2) (A) y (3,3) (B). (Reliasoft, 2015).

1.4.3.2. Modelo experimental.

El desarrollo de los experimentos permite la obtención de datos empíricos que se analizan mediante técnicas de regresión múltiple para la obtención de modelos polinomiales. De este modo, es posible analizar la relación entre las variables independientes o factores y la variable respuesta o dependiente (Armstrong, 2006). Para desarrollar experimentos de cribado, generalmente se utilizan polinomios de primer orden, mientras que en el análisis superficie-respuesta se recurre a polinomios de segundo y tercer orden (NIST/SEMATECH, 2012).

Los modelos polinomiales de primer orden presentan la siguiente estructura:

$$E(y) = \beta_0 + \sum_{i=1}^q \beta_i x_i \quad (\text{Ec. 11})$$

Dado que en un diseño de mezclas todos los componentes del sistema deben sumar 1, entonces:

$$E(y) = \beta_0(x_1 + x_2 + \dots + x_q) + \sum_{i=1}^q \beta_i x_i = \sum_{i=1}^q \beta_i^* x_i \quad (\text{Ec. 12}),$$

siendo $\beta_i^* = \beta_0 + \beta_i$. La forma de Scheffé o canónica los diseños de mezclas, eliminando los asteriscos de los coeficientes β_i^* , se indican en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Expresiones matemáticas de los diferentes modelos de diseño de mezclas.
(Myers et al., 2016).

Denominación	Expresión matemática	
Lineal	$E(y) = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i$	(Ec. 13)
Cuadrática	$E(y) = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j=2}^q \beta_{ij} x_i x_j$	(Ec. 14)
Cúbica completa	$E(y) = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j=2}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum \sum_{i < j=3}^q \delta_{ijk} x_i x_j (x_i - x_j) + \sum \sum \sum_{i < j=3}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k$	(Ec. 15)
Cúbica especial	$E(y) = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j=2}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum \sum_{i < j=3}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k$	(Ec. 16)

Los coeficientes β_i se estiman mediante un análisis de regresión múltiple y muestran el efecto de los componentes de una mezcla $x_i=1$, $x_j=0$, $j \neq i$ en la variable respuesta, tomando un valor positivo o negativo. De este modo, β_1 estima el cambio esperado en la variable respuesta y_1 debido al valor del factor x_1 cuando el resto de variables independientes o factores se mantienen constantes.

Asimismo, es posible estimar un efecto sinérgico o antagónico entre dos componentes de la mezcla, representado por los coeficientes β_{ij} o β_{ijk} (Myers et al., 2016).

El número de experimentos está condicionado por el número de términos del polinomio. De este modo, los modelos cuadráticos con 3 componentes requieren un mayor número de experimentos respecto de los modelos lineales con el mismo número de componentes. Las n observaciones de la variable respuesta dan lugar a y_1, y_2, \dots, y_n , siendo n superior al número de coeficientes β .

También se deben repetir experimentos que permitan ajustar el modelo y estimar la calidad de su ajuste (Myers et al., 2016; NIST/SEMATECH, 2012).

1.4.3.3. Análisis de las observaciones.

Los valores empíricos de los experimentos que constituyen el diseño experimental se pueden presentar en forma de matriz:

$$Y = X\beta + \varepsilon \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde:

$$Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}; X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2k} \\ 1 & x_{31} & x_{32} & \dots & x_{3k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix}; \beta = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix}; \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_k \end{bmatrix}$$

Se observa que y es un vector formado por $nx1$ observaciones, X es la matriz del modelo pxn formada por la composición de los factores en cada observación, β es un vector $px1$ de los coeficientes de regresión y ε es un vector $nx1$ procedente del error aleatorio en cada observación. Cabe destacar que la matriz X consta de una primera columna indicando la ordenada en el origen del modelo (Myers et al., 2016).

Aunque los valores reales de la interacción entre las variables se expresan mediante los coeficientes β , debido a que el resultado experimental de las observaciones se asocia a un error estándar, no es posible calcular su valor exacto y por ello, se recurre a estimadores, gracias a los cuales se obtiene la siguiente expresión:

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_{ij} \quad (\text{Ec. 18})$$

Siendo \hat{y} el valor de la respuesta calculada por el modelo para la observación i , siendo $i=1, 2, \dots, n$. La regresión múltiple de mínimos cuadrados permite estimar coeficientes que minimizan el cuadrado de la diferencia entre el valor calculado y el valor experimental, esto es, el valor residual en todos los experimentos. Por tanto, esta metodología pretende minimizar la expresión:

$$SS_{\text{residual}} = (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (\text{Ec. 19})$$

Los estimadores se agrupan en el vector B , equivalente al vector β , calculado como:

$$B = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_{12} \\ \vdots \\ b_{ij} \end{bmatrix} = (X'X)^{-1}X'Y \quad (\text{Ec. 20})$$

Siendo X' la matriz transpuesta de X , con p líneas y N columnas. $X'X$ es el cuadrado de la matriz de información pxp , el producto de transponer X y multiplicado por

X , que cuando se invierte da lugar a la matriz de dispersión $(X'X)^{-1}$. Las matrices de información y de dispersión permiten calcular los coeficientes de regresión múltiple y valorar la calidad del diseño experimental (Myers et al., 2016).

1.4.3.4. Áreas experimentales irregulares.

Aunque los diseños estándar son ampliamente utilizados, el estudio de áreas experimentales irregulares requiere de diseños experimentales estimados por ordenador, siendo uno de los programas informáticos más utilizados Design Expert®. Los diseños realizados por ordenador se basan en un algoritmo de optimización específico para un modelo determinado (NIST/SEMATECH, 2012).

El criterio de optimización seguido por el diseño D-optimal se basa en maximizar el determinante de la matriz de información $|X'X|$; minimizando la varianza asociada a las estimaciones de cada parámetro. La optimización de un diseño D-optimal es modelo-dependiente, de forma que el experimentador debe especificar un modelo para que el algoritmo pueda generar las combinaciones de factores (experimentos) (NIST/SEMATECH, 2012). También se debe considerar que no todos los experimentos aportan la misma cantidad de información. De este modo, los puntos centrales de un área experimental aportan poca información para un modelo de primer grado, mientras que los puntos localizados en los extremos permiten estimar con mayor precisión las interacciones de primer orden entre dos factores (Lewis et al., 1998).

1.4.3.5. Análisis de la utilidad del modelo mediante contraste de hipótesis.

En los análisis de regresión múltiple, los procedimientos de contraste de hipótesis permiten validar la utilidad de los elementos del modelo:

1. Análisis sobre la significancia de la regresión. Identifica si existe una relación lineal entre la variable respuesta y y el subgrupo de variables x_1, x_2, \dots, x_k :

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$$

$$H_1: \beta_j \neq 0 \text{ para al menos un valor de } j.$$

El rechazo de la hipótesis nula (H_0) implica que al menos una de las variables de regresión contribuye al modelo de manera significativa. El procedimiento

requiere el desglose de la suma de cuadrados total en la suma de cuadrados asociada al modelo y a los residuales, es decir:

$$SC_{total} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2 = SC_{regresión} + SC_{residual} \quad (\text{Ec. 21})$$

Si la hipótesis nula se cumple, entonces $SC_{regresión}/\sigma^2$ se distribuye siguiendo X_k^2 , donde el número de grados de libertad de X_k^2 es igual al número de variables de regresión del modelo. Además, se observa que $SC_{regresión}/\sigma^2$ se distribuye como X_{n-k-1}^2 y que $SC_{regresión}$ y que $SC_{residual}$ son independientes. De este modo:

$$F_0 = \frac{SC_{regresión}/k}{SC_{residual}/(n-k-1)} = \frac{CM_{regresión}}{CM_{residual}} \quad (\text{Ec. 22})$$

Se rechaza H_0 si F_0 excede $F_{\alpha, k, n-k-1}$. Además, se puede utilizar el valor de p para contrastar ambas hipótesis y por tanto, rechazar la hipótesis nula si el valor de p para F_0 es inferior a α . Este test se denomina análisis de la varianza (ANOVA), ya que se basa en el desglose de la variabilidad de la variable respuesta y (Tabla 1.7).

Tabla 1.7. Análisis de la varianza. (Myers et al., 2016).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de F_0
Regresión	$SC_{regresión}$	k	$CM_{regresión}$	$CM_{regresión}/CM_{residual}$
Residual	$SC_{residual}$	n-k-1	$CM_{residual}$	-
Total	SC_{total}	n-1	-	-

El coeficiente de determinación múltiple R^2 se calcula utilizando la siguiente expresión:

$$R^2 = \frac{SC_{regresión}}{SC_{total}} \quad (\text{Ec. 23})$$

Se trata de una medida de la reducción de la variabilidad de y obtenida mediante el uso de variables de regresión x_1, x_2, \dots, x_k , y debe tomar valores entre 0 y 1, ambos incluidos. La incorporación de una nueva variable al modelo reducirá R^2 , independientemente de la significación estadística del nuevo término. Por ello, modelos con valores elevados de R^2 pueden hacer predicciones poco acertadas

de nuevas observaciones. En consecuencia, se debe estimar el coeficiente de determinación ajustado (R^2 ajustado):

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{\frac{SC_{residual}}{n-p}}{\frac{SC_{total}}{n-1}} = 1 - \frac{n-1}{n-p}(1 - R^2) \quad (\text{Ec. 24})$$

En general, el valor de R^2 ajustado es similar a R^2 o puede disminuir al incorporar términos innecesarios a la ecuación. Si existe una gran diferencia entre los valores de R^2 ajustado y R^2 , es posible que se hayan incluido términos no significativos en el modelo (Myers et al., 2016).

A partir de los datos de la ANOVA, también es posible estimar el término *Adequate precision*. Se trata de una ratio entre la señal y el ruido. Compara el rango de valores predichos en los puntos del diseño respecto del error de predicción medio. Los valores superiores a 4 indican la discriminación del modelo adecuado.

$$\frac{\max(\hat{y}) - \min(\hat{y})}{\sqrt{\frac{p\hat{\sigma}^2}{n}}} > 4 \quad (\text{Ec. 25})$$

Siendo $p\hat{\sigma}^2$ los cuadrados medios residuales de la tabla de la ANOVA, p el número de términos del modelo y n , el número de observaciones en el diseño.

2. Analizar la significación de un coeficiente del modelo. La inclusión de una variable no necesaria en el modelo provoca el aumento de la $SC_{regresión}$ y por tanto, de la $CM_{regresión}$, lo que reduce la utilidad del modelo.

El contraste de hipótesis se plantea de forma similar al apartado anterior:

$$H_0: \beta_j = 0$$

$$H_1: \beta_j \neq 0$$

De este modo, si $H_0: \beta_j = 0$ no se rechaza, entonces el término x_j pueden ser eliminado del modelo. El test estadístico para esta hipótesis es:

$$t_0 = \frac{b_j}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 c_{jj}}}$$

Donde C_{jj} es la diagonal de $(X'X)^{-1}$ correspondiente al coeficiente de regresión b_j . La hipótesis nula $H_0: \beta_j=0$ se rechaza si $|t_0| > t_{\frac{\alpha}{2}, n-k-1}$, aunque un valor de p también puede ser estimado y considerado en el contraste de hipótesis. Se debe tener en cuenta que este es un test parcial, porque b_j depende de las otras variables regresión x_i ($i \neq j$) en el modelo.

3. Analizar la significación de un grupo de coeficientes. El procedimiento se llama método de suma de cuadrados extra y permite analizar la contribución al modelo de un grupo de variables de regresión.

En un modelo definido como:

$$y = X\beta + \varepsilon$$

en el que y es una matriz $nx1$, X es $n \times p$, β es $p \times 1$ y ε es $nx1$, y $p = k + 1$. De este modo, los dos coeficientes de regresión β_1 y β_2 se presentan como:

$$y = X_1\beta_1 + X_2\beta_2 + \varepsilon$$

en el que X_1 representa la columna de X asociada a β_1 y X_2 representa la columna de X asociada a β_2 . β_1 es una matriz $r \times 1$ y β_2 es $(p-r) \times 1$.

Se plantean las siguientes hipótesis:

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Siendo el estimador de β ($b = (X'X)^{-1}X'y$), se puede calcular $SC_R(\beta) = b'X'y$, es decir, la suma de cuadrados de la regresión debido a β . Para analizar la contribución de β_1 a la regresión, se ajusta el modelo para que la $H_0: \beta_1 = 0$ se cumpla; entonces, el modelo reducido entonces toma la forma:

$$y = X_2\beta_2 + \varepsilon \quad (\text{Ec. 26})$$

El aumento en la suma de cuadrados asociada a la incorporación de β_1 , habiendo incluido β_2 en el modelo es:

$$SC_{\text{regresión}}(\beta_1 | \beta_2) = SC_{\text{regresión}}(\beta) - SC_{\text{regresión}}(\beta_2) \quad (\text{Ec. 27})$$

Esta suma de cuadrados de regresión presenta r grados de libertad. Por tanto, se analiza se calcula el valor de F_0 mediante la fórmula:

$$F_0 = \frac{\frac{SC_{regresión}(\beta_1 | \beta_2)}{r}}{CM_{residual}} \quad (\text{Ec. 28})$$

De este modo, si F_0 excede $F_{\alpha, k, n-k-1}$, se rechaza H_0 , concluyendo que al menos uno de los parámetros en β_1 es distinto de 0 y en consecuencia, alguna de las variables x_1, x_2, \dots, x_r en X_1 contribuye al modelo de regresión.

1.4.3.6. Parámetros de ajuste del modelo estadístico

Durante su desarrollo, es necesario asegurar que el modelo estadístico aporta una aproximación adecuada al verdadero sistema. Asimismo, se debe comprobar que no trasgrede ninguna de las asunciones consideradas durante la regresión por mínimos cuadrados (Myers et al., 2016):

Análisis de residuales.

Los residuales son estimaciones del error experimental y se calculan sustrayendo el valor de la respuesta real u observada de la respuesta predicha por el modelo previamente calculado a partir de los datos experimentales ($e_i = y_i - \hat{y}_i$). Debido a que es una forma de error, se asume que los residuales siguen las siguientes asunciones: se espera que sigan una distribución normal e independiente, con una media de cero y una varianza constante (NIST/SEMATECH, 2012). La asunción de normalidad de los residuales se comprueba mediante un gráfico de normalidad. Se trata de un procedimiento gráfico para analizar de forma aproximada si un conjunto de datos sigue una distribución normal. Consiste en representar los datos respecto de una distribución normal teórica, de forma que los puntos deben seguir una línea recta. Las desviaciones de esta línea recta indican que los residuales no siguen una distribución normal y por tanto, se recomienda la transformación de la variable respuesta (Figura 1.29A).

También se representan gráficamente los residuales respecto de la respuesta predicha por el modelo (\hat{y}_i). La distribución aleatoria de los residuales sugiere que la varianza de las observaciones originales es constante para todos los valores de y (Figura 1.29B). Si la varianza de la respuesta depende de un valor medio de y , entonces el gráfico adquiere forma de embudo, indicativo de la necesidad de transformar la respuesta.

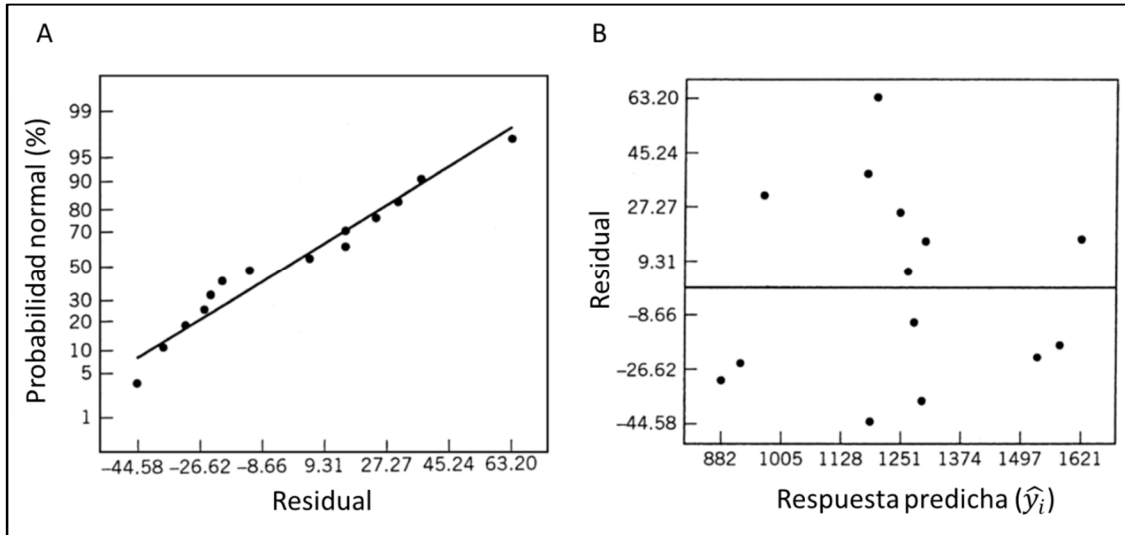


Figura 1.29. Análisis de residuales: gráfico de normalidad (A) y representación de residuales respecto de respuesta predicha (\hat{y}_i). (Myers et al., 2016).

A menudo también se representan los residuales respecto del valor de la observación. Una distribución no aleatoria de los puntos en el gráfico indica la falta de adecuación del modelo y por tanto, la necesidad de transformar la respuesta.

También es frecuente analizar un modelo superficie respuesta utilizando los residuales estudentizados, que presentan una media de cero y cuya varianza es la unidad. Estos residuales son útiles para la búsqueda de valores atípicos.

La suma de los cuadrados de error de predicción (PRESS) se calcula para una observación i , para la cual el modelo de regresión se ajusta para las observaciones $n-1$ restantes, y que permiten calcular la observación y_i . Considerando el valor predicho como $\hat{y}_{(i)}$, el error de predicción del punto i , se define como $e_{(i)} = y_i - \hat{y}_{(i)}$.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 = \sum_{i=1}^n [y_i - \hat{y}_{(i)}]^2 \quad (\text{Ec. 29})$$

En general, una gran diferencia entre los residuales ordinarios y los residuales PRESS para un punto indica que el modelo perdería una gran capacidad de predicción sin dicho punto.

Asimismo, el valor de PRESS se puede utilizar para calcular un valor R^2 de predicción:

$$R_{predicción}^2 = 1 - \frac{PRESS}{SC_{total}} \quad (\text{Ec. 30})$$

Este valor sugiere la capacidad de predicción del modelo de regresión y puede tomar valores entre 0 (mínima capacidad de predicción) y 1 (máxima capacidad de predicción).

Diagnóstico de influencia.

A menudo se encuentran observaciones con una elevada influencia en el modelo de regresión, de forma que las estimaciones de parámetros del modelo o predicciones de respuestas pueden depender más de este conjunto de datos respecto del resto de observaciones.

Las observaciones más influyentes, denominadas *Leverage points*, se pueden identificar mediante la matriz $H = X(X'X)^{-1}X'$. H determina las varianzas y las covarianzas de \hat{y} y e_i , ya que $\text{Var}(\hat{y}) = \sigma^2 H$ y $\text{Var}(e) = \sigma^2(I - H)$.

La diagonal del elemento i en la matriz H es h_{ii} y puede interpretarse como la cantidad de influencia ejercida por y_i en \hat{y}_i . A causa de que $\sum_{i=1}^n h_{ii} = \text{rango}(H) = \text{rango}(X) = p$, el tamaño medio del elemento de la diagonal de la matriz H es p/n . A modo de orientación, se puede decir que si un elemento de la diagonal $h_{ii} > 2p/n$, la observación i es un punto de alta influencia.

Análisis de falta de ajuste.

En la metodología superficie-respuesta, se suele obtener dos o más observaciones de un mismo experimento para analizar la falta de ajuste del modelo. Estos puntos replicados se usan para obtener una estimación modelo independiente de σ^2 .

Teniendo n_i observaciones en la respuesta al nivel i del experimento x_i , siendo $i=1, 2, \dots, m$, y_{ij} se refiere a la observación número j de la respuesta en x_i , $i=1, 2, \dots, m$ y $j=1, 2, \dots, n_j$, se plantean $n = \sum_{i=1}^m n_i$ observaciones.

El procedimiento del test consiste en separar la suma de cuadrados residuales en dos componentes:

$$SC_{\text{residuales}} = SC_{PE} + SC_{LOF} \quad (\text{Ec. 31})$$

Siendo SC_{PE} la suma de cuadrados debidos al error puro y SC_{LOF} es la suma de cuadrados asociada a la falta de ajuste.

$$SC_{PE} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (\text{Ec. 32})$$

Donde \bar{y}_i es la media de las n_i observaciones de x_i . A causa de que hay n_i-1 grados de libertad del error puro a cada nivel de x_i , el total de grados de libertad asociado a la SC_{PE} es:

$$\sum_{i=1}^m (n_i - 1) = n - m \quad (\text{Ec. 33})$$

La SC_{LOF} se estima como:

$$SC_{LOF} = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{Ec. 34})$$

Siendo una suma ponderada de los cuadrados de la diferencia entre la repuesta media \bar{y}_i a cada experimento x_i y su correspondiente valor ajustado \hat{y}_i . Hay $m-p$ grados de libertad asociados a la SC_{LOF} , a causa de que hay m niveles de x , pero de ellos, p parámetros se estiman a partir del modelo. De este modo, el test estadístico para la falta de ajuste se expresa como:

$$F_0 = \frac{\frac{SC_{LOF}}{m-p}}{\frac{SC_{PE}}{n-m}} = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}} \quad (\text{Ec. 35})$$

Para analizar la falta de ajuste, se calcula el valor de F_0 , de forma que si $F_0 > F_{\alpha, m-p, n-m}$, el modelo deberá ser sustituido por otra ecuación con mejor ajuste.

1.4.3.7. Transformación de la variable respuesta

La transformación de la variable respuesta suele realizarse cuando el análisis residual indica que no se cumplen alguna de las asunciones del modelo. En general, las transformaciones se utilizan con tres objetivos: 1) estabilizar la varianza de la variable respuesta, 2) hacer que la distribución de la variable respuesta sea cercana a una distribución normal, y 3) mejorar el ajuste del modelo a los datos. Este último objetivo puede permitir la simplificación del modelo, eliminando los términos de interacción o los términos polinomiales de mayor orden (Lewis et al., 1998; Myers et al., 2016).

El grupo de transformaciones $y^* = y^\lambda$ han demostrado ser útiles (Lindsey, 1972), siendo λ el parámetro de la transformación que se debe calcular. Box y Cox demostraron que λ puede ser estimado simultáneamente con otros parámetros del modelo, utilizando el método de máxima probabilidad. El procedimiento utilizado actualmente por

ordenador consiste en realizar un análisis de la varianza para varios valores de λ (Box y Cox, 1964; Sakia, 1992):

$$y^\lambda = \begin{cases} \frac{y^{\lambda-1}}{\lambda \bar{y}^{\lambda-1}}; \lambda \neq 0 \\ \bar{y} \ln y; \lambda = 0 \end{cases} \quad (\text{Ec. 36})$$

Donde $\bar{y} = (\ln[(1/n) \sum \ln y])^{-1}$ es la media geométrica de las observaciones. La estimación de máxima probabilidad de λ es el valor para el que la suma de cuadrados de residuales ($SC_{\text{residual}}(\lambda)$) es un mínimo. El procedimiento para calcular λ generalmente consiste en representar en un gráfico $SC_{\text{residual}}(\lambda)$ versus λ y estimar el valor para el que λ minimiza el resultado de $SC_{\text{residual}}(\lambda)$. Aunque λ es una variable continua, su valor se suele redondear a alguno de los indicados en la Tabla 1.8, de forma que la interpretación de la variable respuesta transformada sea lo más sencilla posible.

Tabla 1.8. Valores de λ y su correspondiente transformación de la respuesta. (Lewis et al., 1998).

Valor de λ	Tipo de transformación
1	No se necesita transformación
0,5	Raíz cuadrada
0	Logarítmica
-0,5	Inversa de la raíz cuadrada
-1	Inversa

Asimismo, es posible calcular el intervalo de confianza de λ utilizando la siguiente expresión:

$$SC^* = SC_E(\lambda) \left(1 + \frac{t_{\alpha}^2}{\frac{2v}{v}} \right) \quad (\text{Ec. 37})$$

Donde v es el número de grados de libertad y SC^* es el valor de $SC_E(\lambda)$ en el que se registran los intervalos de confianza de λ . De este modo, en el ejemplo representado en la Figura 1.30, el intervalo de confianza de λ (azul) engloba el valor de 0, de manera que la variable respuesta requerirá una transformación logarítmica.

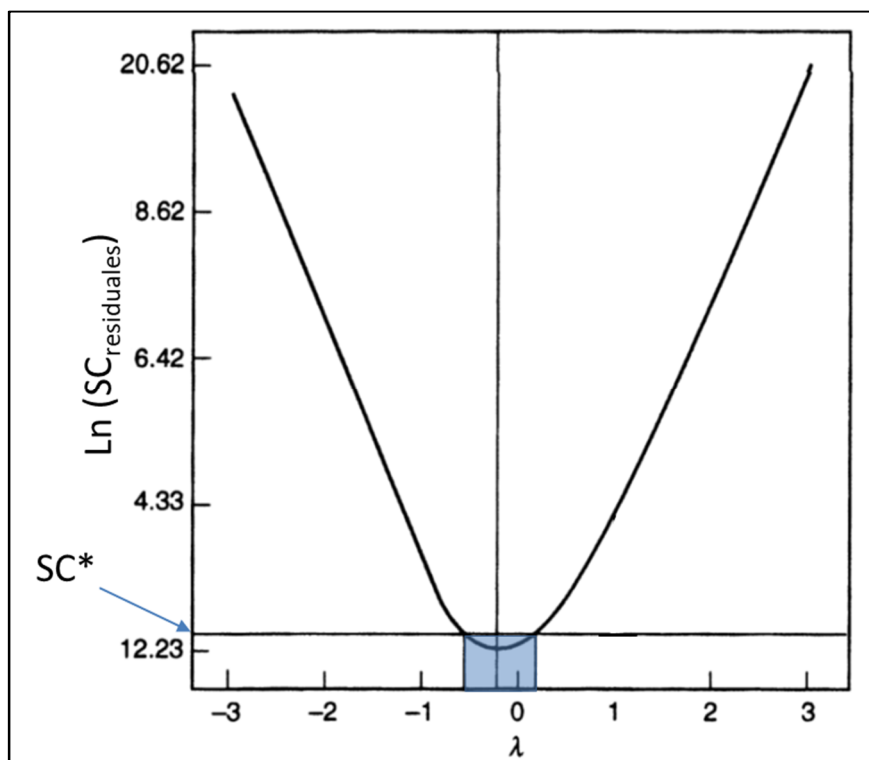


Figura 1.30. Ejemplo de gráfico procedente del método Box y Cox. (Myers et al., 2016).

1.4.4. Optimización modelo-dependiente

El desarrollo de formulaciones farmacéuticas a menudo se basa en el compromiso entre dos o más variables respuesta contrarias. Por ejemplo, los comprimidos deben presentar una dureza adecuada para soportar los procesos de acondicionamiento, embalaje y transporte, pero también deben cumplir los estándares de la farmacopea relativos al tiempo de desintegración, que suele incrementarse con el aumento en la dureza de los comprimidos. Por ello, se requiere un compromiso entre ambas variables, dureza y tiempo de desintegración, que permitan alcanzar una formulación de comprimidos óptima (Armstrong, 2006).

En el proceso experimental, tras establecer los factores e interacciones que determinan una respuesta, es posible predecir el resultado de una combinación de varios factores no analizada empíricamente. La predicción se realiza mediante la derivación de un modelo matemático que relaciona la respuesta y los factores o las variables independientes (Armstrong, 2006). El proceso de optimización puede consistir en seleccionar una zona óptima, definida por un umbral superior e inferior, dentro de la región experimental o bien, establecer una única solución y un índice de satisfacción, que

aumente a medida que la respuesta se acerca al valor diana, para obtener el mejor resultado (Lewis et al., 1998).

Uno de los procedimientos utilizados para la optimización de una formulación, a partir de los resultados en una o varias respuestas, es la función de deseabilidad, presentada por Derringer y Suich (Derringer y Suich, 1980). La función de deseabilidad se define como:

$$d_n = \frac{|Y_n - U_n|}{|T_n - U_n|} \quad (\text{Ec. 38})$$

En donde para cada respuesta Y_i se asocia un valor diana T_i y un valor no aceptable U_i que dan lugar a una respuesta de deseabilidad parcial d_i , que puede tener valores entre 0 (mínima deseabilidad) y 1 (máxima deseabilidad). Los resultados de cada respuesta parcial se pueden combinar para dar lugar a una función global de deseabilidad:

$$D = (d_1 * d_2 * \dots * d_n)^{1/n} \quad (\text{Ec. 39})$$

En donde D es la media geométrica de todas las funciones parciales y muestra la deseabilidad global de las respuestas Y_i estimadas por el modelo. Los valores de D se encuentran entre 0 (mínima deseabilidad) y 1 (máxima deseabilidad). El valor máximo de D indicaría un punto en el área de estudio de mezclas con las características más deseables, para una o varias variables-respuesta. Al tratarse de la media geométrica de las deseabilidad parciales, si algún resultado no es deseable ($d_i=0$) y por tanto, $D=0$, de forma que la respuesta no es deseable (Armstrong, 2006; Cornell, 2002).

De este modo, el modelo puede predecir el resultado estos puntos para cada una de las respuestas analizadas, así como estimar un intervalo de confianza, en función del ajuste del modelo, utilizando la siguiente expresión:

$$\hat{y}_l \pm t_{(1-\frac{\alpha}{2}, n-p)} \cdot \sqrt{\hat{\sigma}^2 x'_0 (X'X)^{-1} x_0} \quad (\text{Ec. 40})$$

Siendo α el nivel de confianza (Armstrong, 2006; Cornell, 2002).

1.4.4.1. Validación del modelo

Los valores obtenidos de la optimización anterior deben ser analizados experimentalmente en el laboratorio. De este modo, es posible comparar los resultados

teóricos de las soluciones de la optimización y los valores reales, comprobando que el resultado real se encuentra dentro del intervalo de confianza del valor predicho por el modelo (Martinello et al., 2006).

Asimismo, algunos autores han comparado la variación entre los valores predichos y los observados estimando el porcentaje de error, mediante la fórmula (Das et al., 2016; Malakar et al., 2012; Mohamad Zen et al., 2015):

$$Error(\%) = \left| \frac{Valor\ observado - Valor\ predicho}{Valor\ predicho} \right| * 100 \quad (Ec. 41)$$

También es posible comparar los resultados teóricos y experimentales utilizando una prueba t de *Student* de muestras pareadas. Di Monaco *et al.* desarrollaron unos chips de avellana, considerando el contenido de grasa, jarabe de glucosa y albúmina mediante un modelo *Simplex Lattice*. Las características organolépticas de los chips fueron evaluadas y su composición optimizada utilizando la función de deseabilidad. Las soluciones del proceso de optimización con mayores resultados de deseabilidad fueron elaboradas experimentalmente y analizadas. Los resultados se compararon utilizando una prueba t de *Student*, indicando que no había diferencias entre los valores predichos y observados (Di Monaco et al., 2010).

Independientemente del método de validación utilizado, las investigaciones basadas en el desarrollo de diseños de mezclas deben incluir este proceso de validación final, que compare los resultados teóricos con los obtenidos en el laboratorio. Cabe destacar la necesidad de este proceso para asegurar la aplicabilidad del modelo estadístico al objetivo de investigación práctico (Buruk Sahin et al., 2016).

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Recientemente, el ICA ha desarrollado una nueva subespecie de *A. absinthium*, cuyos extractos carecen de tujonas. La carencia de estos compuestos tóxicos, convierten dichos extractos en sustancias naturales con una prometedora actividad nematocida, que pueden utilizarse como alternativa a los tratamientos antihelmínticos actuales, considerando los efectos secundarios de los mismos y los problemas de resistencias documentados. Sin embargo, las características fisicoquímicas y farmacotécnicas del extracto requieren del desarrollo de formulaciones galénicas que mejoren la biodisponibilidad y el acceso de los componentes nematocidas del extracto natural a las estructuras internas del nematodo para llevar a cabo su mecanismo de acción.

El objetivo de la presente investigación consiste en el desarrollo de formulaciones del extracto SN1-2010 de *A. absinthium* que mejoren sus características farmacotécnicas, su biodisponibilidad y acción nematocida frente a parásitos intestinales. Dado que la producción de estos extractos naturales es por el momento limitada, se deben utilizar métodos estadísticos que permitan el análisis adecuado del extracto y la optimización en el desarrollo de las nuevas formulaciones. Para conseguir este objetivo general, se han considerado los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis y selección de emulgentes químicamente compatibles para la formulación del extracto de *A. absinthium* en microemulsiones de administración oral.
2. Desarrollo y optimización de una microemulsión del extracto de *A. absinthium* utilizando un diseño de mezclas.
3. Estudio de la actividad nematocida de la formulación anterior en un modelo murino *ex vivo* de *T. spiralis*.
4. Análisis de la cinética de liberación de la microemulsión del extracto incorporada a un material de sílice.
5. Desarrollo de una formulación en comprimidos mediante la incorporación de la microemulsión del extracto de *A. absinthium* a un material de sílice y su posterior compresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Equipos de laboratorio

- Agitador de tubos VORTEX MIXER (Fisher scientific, Estados Unidos)
- Agitador magnético AGIMATIC-N (Grupo Selecta, España)
- Equipo de agua Elix[®]. (Merk Millipore, Estados Unidos)
- Balanza de precisión Mettler Toledo AG104 (Mettler Toledo, Estados Unidos)
- Balanza Mettler AJ 100 (Mettler Toledo, Estados Unidos)
- Calibre Mannesmann M 825-150 (Brüder Mannesmann AG, Alemania)
- Centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Alemania)
- Equipo pHmetro pH-meter basic 20+ (Crison Instruments, España).
- Espectrofotómetros: Beckman DU-7 (Beckman Coulter, Estados Unidos), Shimadzu UV-1700 (Shimadzu Scientific Instruments, Japón) y Thermo Fisher AquaMate 8000 (Thermo Fisher, Estados Unidos).
- Analizador de tamaño de partícula y potencial Z: Zetasizer[®] NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido)
- Conductímetro Metrohm 644 (Metrohm AG, Suiza)
- Celda de conductividad Crison 5292 con platos de platino paralelos (Crison Instruments, España)
- Equipo de velocidad de disolución Sotax AT7 (Sotax, Suiza)
- Equipo analizador de propiedades de flujo JELSTAV 2003 (J. Engelsmann AG, Alemania).
- Mezcladora Turbula[®] T2F (Willy A. Bachofen AG Maschinenfabric, Suiza),
- Máquina de análisis de materiales universal EZ20 (Lloyd Instruments Ltd, Reino Unido)
- Equipo de desintegración Vanderkamp 71b-174B-6 (Vankel Industries, INC., Chatham, Canadá)
- Pipetas automáticas: Gilson (Gilson Incorporated, Estados Unidos), Eppendorf PhysioCare Concept (Eppendorf, Alemania), Boeco (Alemania) y Transferpette[®] (BRAND W-Germany),
- Reómetro Anton Paar (MCR102, Austria)

- Ultra Turrax® T25 Basic (IKA Labortechnik, Alemania)

3.1.2. Fases oleosas

- Extracto SN1-2010 de *A. absinthium*, que fue donado por el ICA.
- Aceite de oliva, como modelo de fase oleosa.

3.1.3. Emulgentes y coemulgentes

- Labrasol® (Sigma Aldrich Quimica, S.A., España).
- Tween® 80 o polisorbato 80 (Sigma Aldrich Quimica, S.A., España).
- Lauroglycol® FCC (Gattefossé, España).
- Plurol Oleique® (Gattefossé, España).
- Propilenglicol (Sigma, España).

3.1.4. Reactivos

- Pepsina porcina (P-7000; actividad específica: 800–2500 U/mg) (Sigma Aldrich Quimica, S.A., España).
- Celulosa microcristalina, Ph. Eur. (Avicel® PH102), de Merck (Overijse, Bélgica)
- Croscarmelosa sódica, NF (Ac-Di-Sol®), (FMC Health and nutrition, Estados Unidos).
- Almidón pregelatinizado, StarCap 1500® Colorcon (Dartford, Reino Unido)
- Estearato magnésico (Omega pharma NV, Zwevegem, Bélgica),
- Silicagel mesoporoso (Syloid® XDP 3150), Grace Davison (Worms, Alemania).
- Dióxido de sílice coloidal (Syloid® 244 FP), Grace Davison (Worms, Alemania).
- Cloruro potásico (KCl), Panreac (Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico 37%, Panreac (Barcelona, España).

3.1.5. Otros materiales

- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro 104-QS Hellma 10 mm.
- Cubetas de plástico de espectrofotometría de 4,5 mL.
- Microbureta de 5 mL.
- Eppendorf de 0,5; 1,5 y 2 mL (Sarsdtedt, Alemania)
- Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.
- Vasos de precipitados de vidrio de diferentes volúmenes.

- Probetas de vidrio de diferentes volúmenes.
- Viales de vidrio de diversos volúmenes con tapa de goma.

3.1.6. Experimentos *ex vivo*

3.1.6.1. Animales de experimentación

Se han utilizado ratones hembras de la estirpe SWISS CD-1 (Charles River, España), de características uniformes: 8 – 10 semanas y 20 – 25 g. Los animales se mantuvieron en el animalario, en jaulas de tamaño adecuado, a temperaturas de 20-25°C con ciclo de luz controlado, suministrándoles agua y comida *ad libitum* durante todo el periodo de experimentación.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, traspuesto a la legislación española por el Real Decreto 53/2013, sobre el cuidado y el uso de los animales de laboratorio (VISAVET-ES280790000154).

3.1.6.2. Parásito

El modelo parasitario utilizado en los estudios de actividad nematocida fue una cepa aislada de *T. spiralis* MFEL/ES/S2 GM-1-ISS48 (Centro de Referencia de Trichinellosis, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia). Los parásitos se mantuvieron en el laboratorio mediante pases periódicos en ratones Swiss-CD-1.

3.1.6.3. Fármacos

- Penicilina, Sigma Chemical Co., (St. Louis, Estados Unidos).
- Estreptomicina, Sigma Chemical Co., (St. Louis, Estados Unidos).

3.1.6.4. Reactivos

- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Cloroformo, Panreac (Barcelona, España).
- Tampón PBS, Panreac (Barcelona, España).
- Cloruro sódico (NaCl), Panreac (Barcelona, España).
- Cloruro potásico (KCl), Panreac (Barcelona, España).

- Sulfato magnésico heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Fosfato potásico dibásico ($\text{KH}_2(\text{PO}_4)_3$), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Fosfato sódico monobásico, Panreac (Barcelona, España).
- Glucosa Panreac (Barcelona, España).
- Pepsina porcina (P-7000; actividad específica: 800–2500 U/mg) (Sigma Aldrich Química, S.A., España).
- Ácido clorhídrico 37%, Panreac (Barcelona, España).

3.1.6.5. Equipos y aparatos utilizados en los experimentos *ex vivo*.

- Picadora Moulinex, (España).
- Copas de sedimentación.
- Microscopio óptico Olympus BH-2, Olympus Optical Co., LTD, (Japón).
- Balanza Mettler PC 2200 (Suiza).
- Lupa binocular Olympus SZH, Olympus Optical Co., LTD, (Japón).
- Botes de digestión.
- Incubador de microaerobiosis al 5% CO_2 , Nuaire US Autoflow (Plymouth, Estados Unidos).
- Placas de 24 pocillos Costar (Corning, Albany, New Cork, Estados Unidos).
- Placas de Petri.
- Sonda buco gástrica.
- Pinzas y tijeras de acero inoxidable para disección
- Gasas de filtrado.
- Botes de digestión.

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo fueron de elevada pureza. En los experimentos de conductividad y viscosidad se utilizó agua Milli-Q[®], mientras que en los trabajos de desarrollo y optimización de la microemulsión y los comprimidos, se utilizó agua destilada. Ambos tipos de agua son de calidad farmacéutica, adecuada para la elaboración de estas formulaciones (Agencia Europea de Medicamentos, 2018; Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Desarrollo de una microemulsión.

Las microemulsiones se desarrollaron utilizando el método de valoración. Este procedimiento permite conocer la interacción de los emulgentes con las fases acuosa y oleosa, identificando las diferentes fases en el diagrama ternario. De este modo, permite seleccionar de manera exacta los emulgentes más adecuados para la formulación del extracto de *A. absinthium*. El procedimiento de trabajo consistió en la valoración con agua de las mezclas de emulgentes y fase oleosa en agitación constante, hasta observar la formación de la microemulsión, definida como un sistema homogéneo y transparente. Este procedimiento permitió establecer las proporciones de las áreas de microemulsión en los diagramas ternarios. La mezcla de emulgentes capaz de disolver la mayor proporción de agua fue seleccionada para continuar las investigaciones.

3.2.1.1. Descripción de los emulgentes y coemulgentes

Como se ha indicado anteriormente, se llevó a cabo una selección de los emulgentes y coemulgentes candidatos para la formulación del extracto de *A. absinthium*, considerando la teoría del HLB, el PEC y la teoría del parámetro de solubilidad. Se trata de emulgentes no iónicos, ya que presentan menor interacción con la mucosa intestinal. Asimismo, se consideró que la dosis letal 50 (DL₅₀) de los mismos fuera superior al límite de toxicidad aguda oral establecido en 2000 mg/kg, según la normativa europea (European Chemicals Agency (ECHA), 2017). Los emulgentes utilizados en esta investigación fueron:

Labrasol[®]

Se trata de un emulgente de HLB 14 (Djekic y Primorac, 2008; Hauss, 2007), incluido en la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013), obtenido de aceite de coco y que presenta una baja toxicidad en ratas por vía oral (DL₅₀: 22000 mg/kg). Está formado por una mezcla del 30% de mono-, di-, y triglicéridos formados a partir de ácidos grasos de entre 8 y 10 átomos de carbono, 50% de mono- y di-ésteres de polietilenglicol (PEG) 400 y 20% de PEG 400 sin esterificar (Kreilgaard et al., 2000) (Figura 3.1).

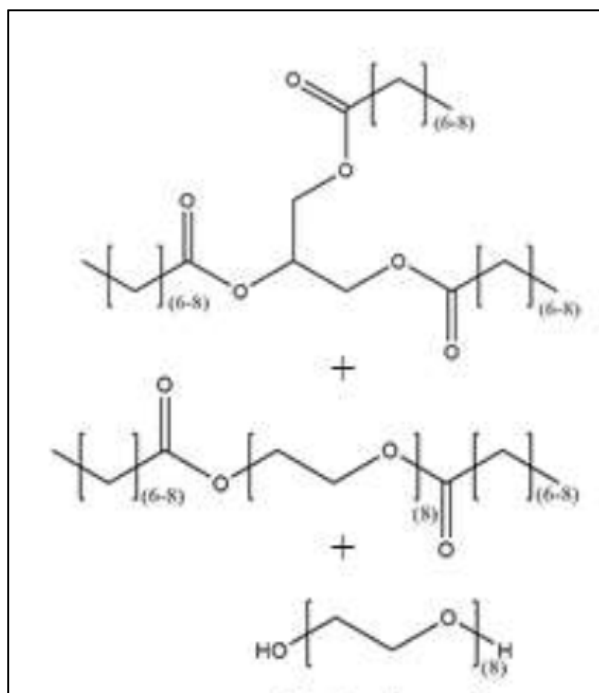


Figura 3.1. Estructura molecular de los componentes del Labrasol®. (Abdel-Hafez et al., 2018).

Labrasol® ha sido ampliamente utilizado en la formulación de fármacos lipófilos, incluyendo extractos vegetales (Lee et al., 2016) y aceite de oliva (Djekic y Primorac, 2008). Se ha observado que aumenta la absorción intestinal de fármacos lipófilos tras su administración oral (Shibata et al., 2001).

Tween® 80 o polisorbato 80 o polioxietilen 20 monoleato de sorbitano.

Se trata de un emulgente que forma emulsiones de fase externa acuosa, al presentar un HLB de 15 (Hauss, 2007). Ha sido ampliamente utilizado como emulgente en diferentes emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones orales, algunas de ellas utilizadas para la vehiculización de extractos vegetales (Du et al., 2014; Golmohammadzadeh et al., 2017; Saha et al., 2012). Al igual que el anterior, presenta una baja toxicidad por vía oral, siendo la DL_{50} 25000 mg/kg en ratones (Rowe, 2009) (Figura 3.2).

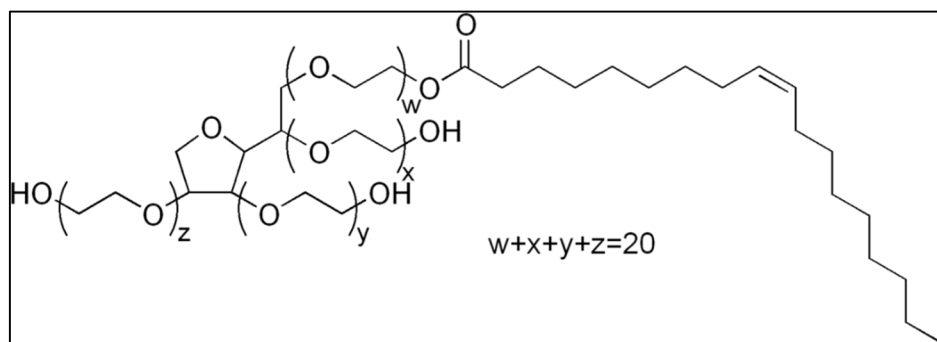


Figura 3.2. Estructura molecular del Tween[®] 80. (Rabiee et al., 2016).

Los coemulgentes presentan cadenas alifáticas más cortas, por lo que aportan flexibilidad a la capa de emulgente situada entre ambas fases inmiscibles. Los coemulgentes fueron:

Lauroglycol[®] FCC o monolaurato de propilenglicol

Se encuentra incluido en la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013) y es capaz de formar emulsiones de fase externa oleosa, al presentar un HLB de 4 (Hauss, 2007). Ha sido utilizado como coemulgente (Balakrishnan et al., 2009) y como agente autoemulsionable (Shakeel et al., 2014; Zhang et al., 2011) (Figura 3.3). Se ha estimado que su DL₅₀ por vía oral en ratas es >2003 mg/kg y por tanto, no está clasificado como peligroso (Gattefosse, 2011a).

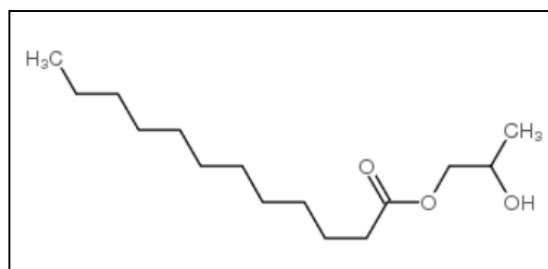


Figura 3.3. Estructura molecular del Lauroglycol[®] FCC. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2019a).

Plurol Oleique[®]:

Contiene poligliceril-6 dioleato y se trata de emulgente capaz de formar emulsiones de fase externa oleosa, al presentar un HLB de 6 (Hauss, 2007). Ha demostrado aportar una mayor flexibilidad a la interfaz formada por moléculas de emulgente, permitiendo la formación de sistemas bicontinuos, que liberan los fármacos anfifílicos por medio de interacciones fármaco-excipientes (Djordjevic et al., 2005).

(Figura 3.4). Se ha estimado que su DL_{50} por vía oral en ratas es >2005 mg/kg y por tanto, no está clasificado como sustancia peligrosa (Gattefosse, 2011b).

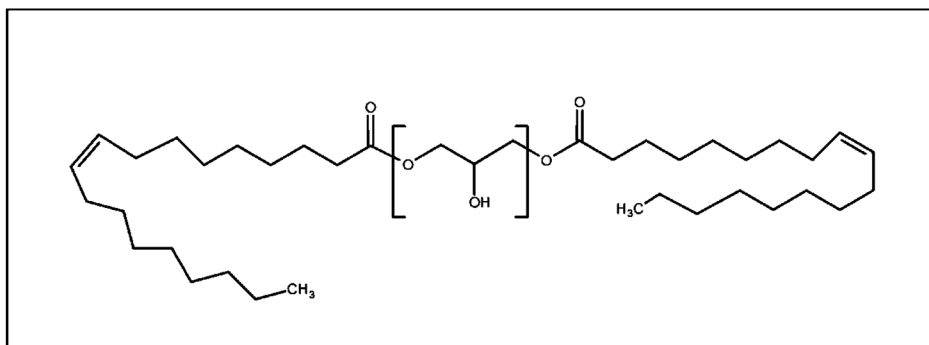


Figura 3.4. Estructura molecular del Plurol Oleique®. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2019b).

Propilenglicol.

Presenta un carácter hidrófilo y se ha estimado su HLB en 8,9 (Bateringhe et al., 2011; Griffin, 1954). Se ha utilizado como coemulgente en microemulsiones y sistemas autoemulsionables (Monteagudo et al., 2014; Salimi et al., 2014). También se ha utilizado como solvente y conservante en gran variedad de formulaciones farmacéuticas parenterales y no parenterales. Presenta una baja toxicidad oral, similar a los emulgentes anteriores, con una DL_{50} de 22000 mg/kg en ratones (Rowe, 2009) (Figura 3.5).

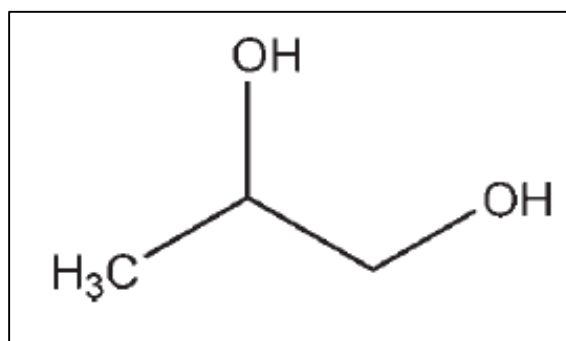


Figura 3.5. Estructura molecular de propilenglicol. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2019c).

3.2.1.2. Microemulsiones formadas por aceite de oliva.

Primeramente, se utilizó aceite de oliva como fase oleosa, debido a su amplia disponibilidad en el mercado y su color claro, que facilita la identificación a simple vista de las diferentes fases de la microemulsion. Se preparó una mezcla formada por Labrasol® y uno de los siguientes coemulgentes: Lauroglicol® o Plurol Oleique®. Como se indica en la Figura 3.6, las mezclas de emulgentes preparadas fueron Labrasol® y Lauroglicol®, en

proporciones 1:1 y 4:1 p/p y Lauroglicol® y Plurol Oleique®, en proporciones 4:1, 2:1 y 1:1 p/p. Posteriormente, el aceite de oliva se incorporó al 10, 20, 30, 40, 50 y 60% p/p. Las mezclas de aceite y emulgentes fueron valoradas con agua en agitación constante a 100 rpm utilizando el agitador magnético AGIMATIC-N (Grupo Selecta, España), hasta la formación de la microemulsión (Djekic y Primorac, 2008). En estudios previos se observó que esta velocidad de agitación es suficiente para la integración de los componentes al sistema sin incorporar aire, ya que esto condicionaría la capacidad del emulgente para formar la microemulsión.

Los resultados se presentaron en diagramas ternarios utilizando el software Triplot (versión 4.1.2, 2009, Todd Thompson) (Barot et al., 2012; Said et al., 2017). Las áreas de microemulsión se calcularon utilizando un *software* por imagen y estimando la extensión de dichas áreas respecto del área total de estudio. Estos resultados se relacionaron con los valores estimados de HLB para cada mezcla de emulgentes (Gattefosse, 2011c, 2011a, 2011b; Rowe, 2009) (Figura 3.6).

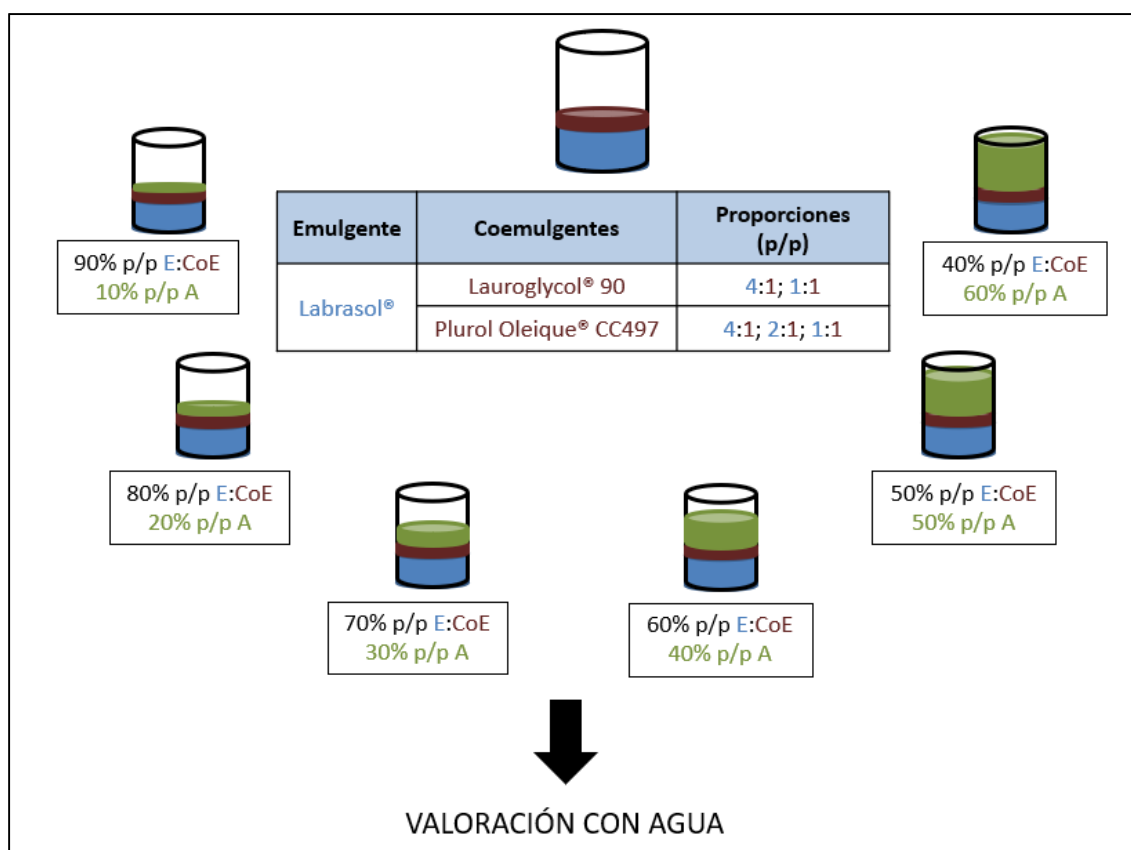


Figura 3.6. Esquema de la composición de las formulaciones de aceite de oliva.
Abreviaturas: A: aceite de oliva; CoE: coemulgente; E: emulgente.

3.2.1.3. Microemulsiones formadas por extracto de *A. absinthium*.

Al igual que en el estudio anterior, se realizó un estudio de cribado con dos emulgentes: Labrasol® y Tween® 80, y uno de los siguientes coemulgentes: propilenglicol, Lauroglicol® o Plurol Oleique®. Cada combinación emulgente:coemulgente (1:1 p/p) fue mezclada homogéneamente con un 10% p/p del extracto de *A. absinthium* y posteriormente valorada con agua en agitación constante a 100 rpm, hasta la formación de la microemulsión (Djekic y Primorac, 2008) (Figura 3.7).

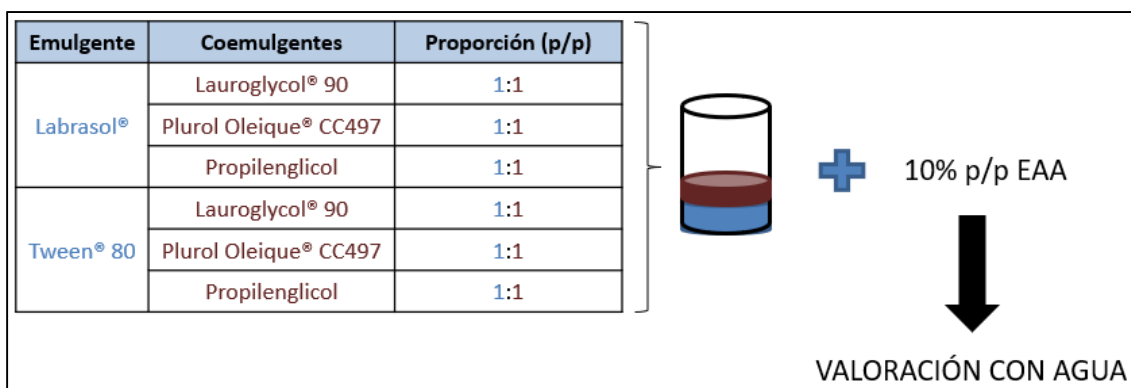


Figura 3.7. Selección de la combinación emulgente:coemulgente. Abreviaturas: EAA: extracto de *A. absinthium*.

La combinación emulgente:coemulgente (1:1 p/p) capaz de disolver la mayor cantidad posible de agua fue seleccionada para desarrollar diagramas pseudoternarios con las proporciones 1:1 p/p; 1,5:1 p/p; 2:1 p/p y 3:1 p/p, usando concentraciones del extracto de *A. absinthium* de 10% p/p, 20% p/p, 30% p/p y 40% p/p. Cada combinación de emulgentes y extracto vegetal fue valorada con agua en agitación constante a 100 rpm hasta observar que el sistema cambia su apariencia transparente y homogénea. Las áreas de microemulsión y los valores HLB de las mezclas de emulgentes se calcularon siguiendo el procedimiento del apartado anterior (Bateringhe et al., 2011; Gattefosse, 2011c, 2011b, 2011a; Griffin, 1954; Rowe, 2009) (Figura 3.8).

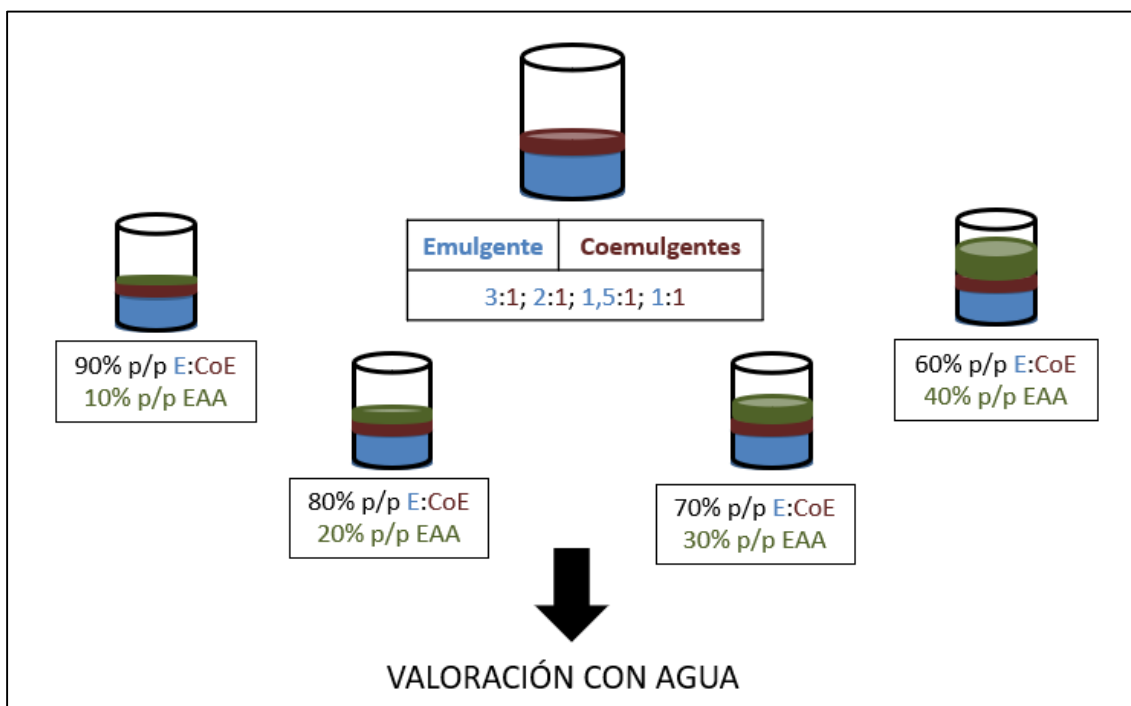


Figura 3.8. Composición de las formulaciones de extracto de *A. absinthium*.
Abreviaturas: EAA: extracto de *A. absinthium*; CoE: coemulgente; E: emulgente.

3.2.1.4. Caracterización de una línea de dilución.

Una línea de dilución se puede definir como el conjunto de puntos procedente de la valoración con agua de una mezcla formada por una fase oleosa y uno o varios emulgentes. El análisis de la línea de dilución se realizó en una mezcla formada por extracto de *A. absinthium* y la combinación de emulgentes seleccionada en el estudio anterior, en proporción 10:90 p/p. Este análisis se realizó de forma discontinua, mezclando las cantidades exactas de cada uno de los componentes con agitación constante a 100 rpm, hasta obtener un sistema homogéneo (Figura 3.9).

Posteriormente, se analizaron las variaciones en la viscosidad y la conductividad de estas preparaciones como consecuencia de la incorporación de agua, siguiendo la línea de dilución.

Viscosidad

La viscosidad de cada mezcla fue analizada utilizando un equipo MCR102 (Anton Paar, Austria) a $25\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$. Se utilizó una geometría de plato de 50 mm de diámetro, con un espacio de 1 mm entre ambos platos (Figura 3.10). Las medidas se tomaron cada 6 s, hasta obtener un total de 20, con una velocidad de deformación de entre 1 y 20 s^{-1} .

Las medidas se realizaron por triplicado. A partir de los resultados de velocidad y fuerza de cizalla, se realizó un análisis de regresión para calcular la viscosidad en Pa·s, utilizando Microsoft® Excel (Microsoft® Office, 2010).

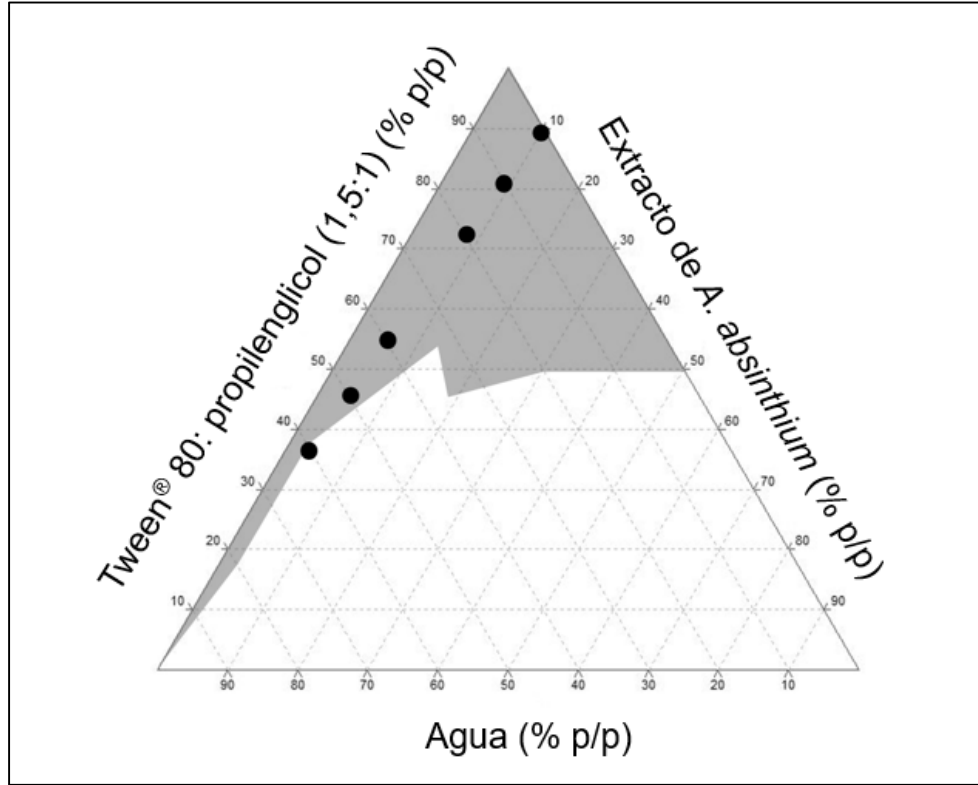


Figura 3.9. Diagrama pseudoternario mostrando la composición de una línea de dilución.

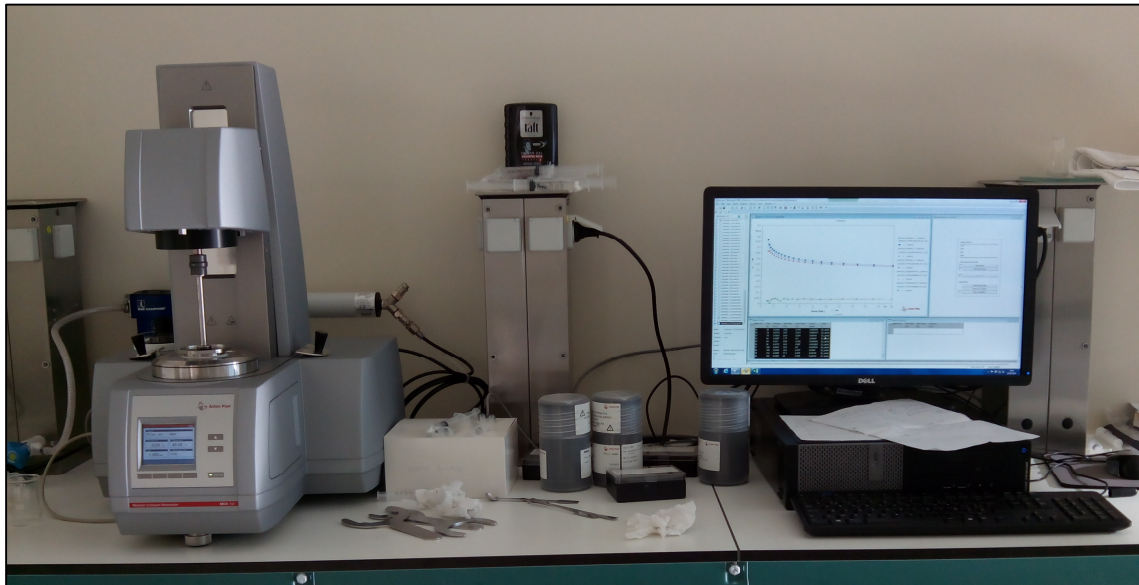


Figura 3.10. Viscosímetro MCR102.

Las muestras también se analizaron a $25 \pm 0,1$ °C; $30 \pm 0,1$ °C; $37 \pm 0,1$ °C, $40 \pm 0,1$ °C, $50 \pm 0,1$ °C y $60 \pm 0,1$ °C. La viscosidad del extracto de *A. absinthium* fue analizada a $25 \pm 0,1$ °C.

Conductividad

La conductividad de la muestra se analizó de manera continua, incorporando agua a una velocidad de agitación de 100 rpm. Se utilizó un conductímetro Metrohm 644 (Metrohm AG, Switzerland) y una celda de conductividad Crison 5292 con platos de platino paralelos (Crison Instruments, Spain). Las medidas se realizaron a 20 °C \pm 0.1 °C (Figura 3.11). Las medidas se realizaron por triplicado.



Figura 3.11. Conductímetro Metrohm 644 y una celda de conductividad Crison 5292 con platos de platino paralelos.

La constante de celda se determinó utilizando patrones de conductividad. Se prepararon 5 disoluciones de cloruro potásico a concentraciones de 10^{-4} M; $5 \cdot 10^{-4}$ M; 10^{-3} M; $5 \cdot 10^{-3}$ M; 10^{-2} M. El cloruro potásico en polvo se mantuvo durante 12 horas en la estufa a 105 °C, para asegurar su desecación. Una vez atemperado en un desecador, se prepararon las disoluciones con agua a las concentraciones indicadas. La medida de la conductividad se realizó utilizando la siguiente ecuación.

$$K=L \cdot C_v, \quad (\text{Ec. 42})$$

Siendo K la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$); L, la conductancia (μS) y C_v la constante de celda (cm^{-1}). Se calculó una recta de regresión lineal a partir de los datos de conductividad a 20 °C (Haynes et al., 2016) y los resultados de conductancia analizados por el conductímetro. La pendiente de la recta de regresión se corresponde con la constante de celda y permite ajustar los resultados de conductancia de la línea de dilución.

A partir de los resultados, se estimó el umbral de percolación, definido como el porcentaje de agua al que se produce un cambio drástico en la conductividad de la mezcla mediante un análisis de regresión lineal (Nazar et al., 2009; Shao et al., 2018). Asimismo, se estimó la ecuación polinomial que mejor se ajustaba a los resultados, y se calculó su derivada con el objetivo de estimar la concentración de agua a la que se registra un cambio en la estructura del sistema, es decir, un cambio desde la microemulsión A/O a una estructura bicontinua o microemulsión O/A (Zargar-Shoshtari et al., 2010).

Todos los cálculos fueron realizados utilizando Microsoft® Excel (Microsoft® Office, 2010) y el software Statgraphics® Centurion XVII

3.2.1.5. Optimización de una microemulsión del extracto de *A. absinthium*.

A partir de los resultados de la selección de excipientes, se utilizó un diseño de mezclas D-optimal para optimizar la composición de la microemulsión. Las variables independientes se corresponden con los componentes de la formulación: agua destilada, extracto de *A. absinthium* y la mezcla de emulgentes seleccionada previamente. El intervalo de la composición de los dos primeros componentes se estableció en 4 - 80% p/p, y el de la mezcla de emulgentes (Tween® 80 y propilenglicol 1,5:1 p/p) a 48 – 82% p/p, definiendo así un área de estudio trapezoidal en el interior del diagrama ternario (Figura 3.12).

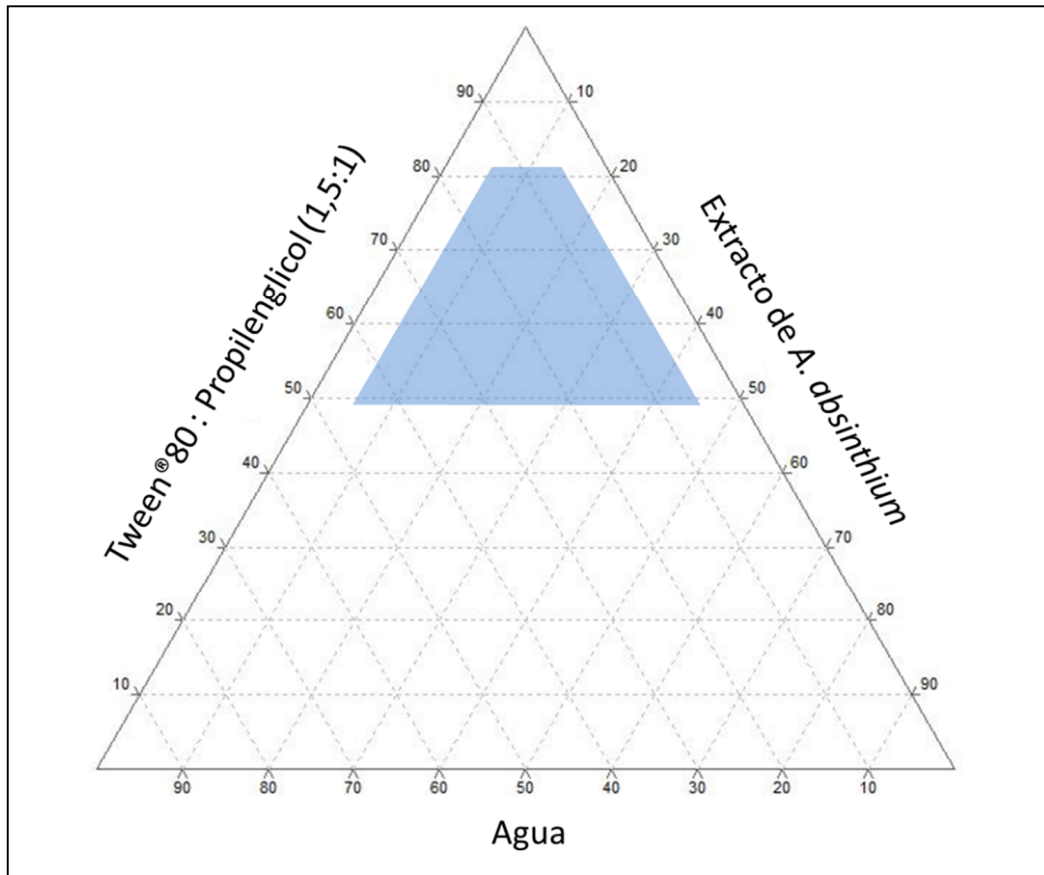


Figura 3.12. Área de optimización en el diagrama ternario.

Considerando esta área experimental, se utilizó el software Design Expert® versión 7 (Stat-Ease Inc, Estados Unidos), para desarrollar 16 experimentos o combinaciones de los 3 componentes mediante un modelo cuadrático. De este modo, este diseño permite conocer la relación de los componentes independientes o en combinación de la mezcla y la variable dependiente (β_i y β_{ij} , respectivamente). Como se ha indicado anteriormente, este modelo estadístico permite estimar la siguiente ecuación:

$$E(y) = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j=2}^q \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{Ec. 43})$$

El procedimiento experimental consistió en preparar cada experimento mezclando las cantidades exactas de los componentes aplicando una agitación constante de 100 rpm con el agitador magnético AGIMATIC-N (Grupo Selecta, España), hasta alcanzar una apariencia homogénea. Después de su preparación, las muestras se mantuvieron en reposo, en recipientes cerrados, durante 24 horas, hasta su caracterización.

3.2.1.5.1. Caracterización de las microemulsiones: tamaño de gotícula y conductividad.

Tamaño de gotícula

Los experimentos diseñados en el apartado anterior fueron analizados utilizando el equipo Zetasizer® NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido), con un láser de longitud de onda de 633 nm, a 25±0,1 °C y una celda capilar plegada (Figura 3.13) (“Malvern. Zetasizer Nano series. User manual,” 2013; Skoog et al., 2007).

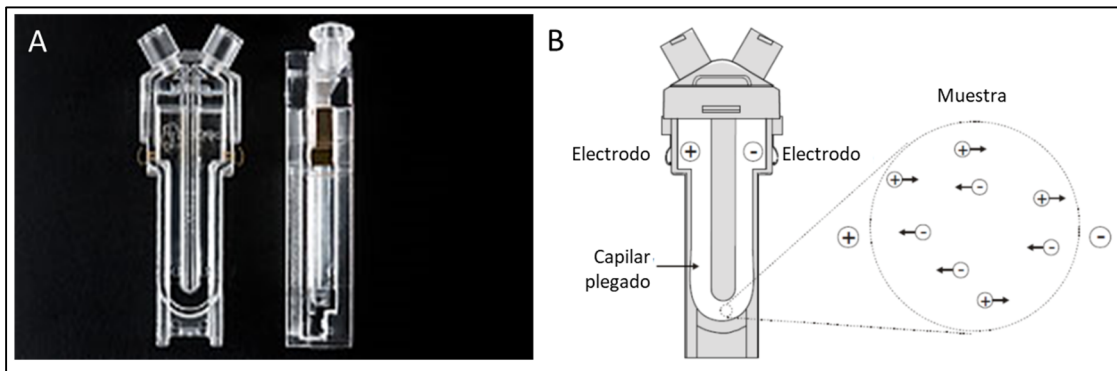


Figura 3.13. Celda capilar plegada: exterior (A) y esquema (B). (“Malvern. Zetasizer Nano series. User manual,” 2013)

El tamaño de gotícula se estimó a partir de los datos de distribución de partículas por número proporcionado por el *software* el equipo Zetasizer® NanoZS. Se consideró que el Tween® 80 constituía el componente principal de las dispersiones y por tanto, se consideró su índice de refracción (1,473) y su viscosidad (425 mPa·s) a 25±0,1 °C, para la estimación de los resultados por número (Rowe, 2009; “Sigma-Aldrich. Polysorbate 80 59924,” 2019). Las medidas se realizaron por quintuplicado, estimando el valor de Q1 (diámetro correspondiente a una frecuencia ≤25% de la muestra), la mediana (diámetro correspondiente a una frecuencia ≤50% de la muestra) y el valor de Q3 (diámetro correspondiente a una frecuencia ≤75% de la muestra). Asimismo, se calculó el diámetro medio de Sauter (D_{32}) para cada experimento con la siguiente ecuación (Koocheki y Kadkhodae, 2011):

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (\text{Ec. 44}),$$

siendo n_i el número de gotículas con un diámetro d_i . De este modo, se estimaron los valores de una variable continua y comparable entre los experimentos. Este

procedimiento ha sido ampliamente utilizado en otras investigaciones basadas en diseño de experimentos para la formulación de emulsiones y nanoemulsiones (Koocheki y Kadkhodaei, 2011; Sadeghpour Galooyak y Dabir, 2015). Los valores medios de cada experimento fueron considerados para el cálculo del modelo experimental.

Conductividad.

La conductividad eléctrica está relacionada con la presencia y el movimiento de los iones en solución. Permite conocer la estructura del sistema, diferenciando entre microemulsión O/A, bicontinua o A/O (Lagues y Sauterey, 1980; Mehta y Bala, 2000; Rakshit y Moulik, 2008).

La conductividad de cada experimento fue analizada utilizando el equipo Zetasizer® NanoZS. Las celdas capilares plegadas presentan dos electrodos de cobre-berilio, que se utilizan para el análisis electroquímico de las muestras. Al aplicar un potencial en cualquiera de los electrodos de la celda, las partículas cargadas de la muestra se desplazan al electrodo de carga opuesta, y su velocidad se mide como unidad de conductancia eléctrica por longitud. Las medidas de conductividad se estimaron por quintuplicado en mS/cm. Los resultados medios de conductividad fueron considerados para el cálculo del modelo experimental.

Parámetros de optimización.

La composición de la microemulsión se optimizó mediante el software Design Expert®, considerando el tamaño de gotícula, ya que esta variable condiciona directamente la disponibilidad del extracto oleoso. La microemulsión se diseñó para su administración por vía oral, de forma que el extracto oleoso de *A. absinthium* mejore su biodisponibilidad y actividad antinematoda, tanto a nivel sistémico como mediante su penetración a través de la cutícula del nematodo intestinal (Lanusse et al., 2016).

La optimización de la microemulsión se realizó considerando el área de experimentación, maximizando el contenido en el extracto de *A. absinthium* en la formulación optimizada y minimizando el tamaño de gotícula. Nuestra hipótesis se basa en que la microemulsión final estará formada por al menos 48% p/p de la mezcla de emulgentes y que un aumento en el contenido del extracto dará lugar a microemulsiones de fase externa oleosa o bicontinua, según el contenido acuoso de la formulación final.

Los umbrales mínimo y máximo de la composición de excipientes y del extracto de *A. absinthium* considerados en la optimización de la microemulsión se indican en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Límites máximos y mínimos para la optimización de la composición de la microemulsión.

Componente	Mínimo (% p/p)	Máximo (% p/p)
Tween® 80: propilenglicol (1,5:1)	48,00	70,00
Agua	4,74	44,81
Extracto de <i>A. absinthium</i>	4,25	47,05

3.2.1.5.2. Caracterización de la microemulsión optimizada: test de dispersión y análisis reológico.

La dilución de la microemulsión optimizada en su paso por el tracto gastrointestinal puede dar lugar a modificaciones fisicoquímicas de la formulación, que pueden afectar a la biodisponibilidad del extracto de *A. absinthium*. Por tanto, debido al carácter oleoso de la microemulsión optimizada, se analizó su comportamiento en el medio gástrico mediante un test de dispersión.

El test de dispersión se llevó a cabo en un aparato II de disolución USP, siendo la velocidad de la paleta 100 rpm. Se tomaron 4,1 g de la ME optimizada, que se dispersaron en un medio gástrico artificial (250 mL) preparado siguiendo las condiciones de la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013). Seguidamente se tomaron muestras de 5 mL a los 15 y a los 30 minutos, que fueron analizadas en función de su tamaño de gotícula utilizando el equipo Zetasizer® NanoZS. También se estimó el D_{32} , de forma similar a los estudios anteriores de caracterización. Los análisis se realizaron por triplicado. Las muestras del estudio de dispersión también fueron analizadas en función de su transparencia, a una longitud de onda de 800 nm, utilizando el espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 (Shimadzu Scientific Instruments, Japón). Los experimentos se realizaron por triplicado.

También se analizó la viscosidad de la microemulsión optimización siguiendo el procedimiento anteriormente indicado, utilizando un equipo MCR102, a 25°, 30 y 37° C. Los resultados se compararon con el análisis reológico del extracto de *A. absinthium* a 25° C. Como en los análisis anteriores, a partir de los resultados de velocidad y fuerza de

cizalla, se realizó un análisis de regresión para calcular la viscosidad en Pa·s, utilizando Microsoft® Excel (Microsoft® Office, 2010).

3.2.2. Análisis de la actividad nematocida de una microemulsión del extracto de *A. absinthium*.

Como se ha indicado anteriormente, la actividad nematocida del extracto de *A. absinthium* ha sido analizada previamente mediante un modelo murino *ex vivo* e *in vivo*, utilizando larvas L1 de *T. spiralis* (García-Rodríguez et al., 2015). En base a estos resultados, en la presente investigación se comparó la actividad de la microemulsión optimizada respecto de una solución del extracto de *A. absinthium*.

3.2.2.1. Preparación del medio HBSS.

El medio *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) se utilizó para el mantenimiento de las larvas de *T. spiralis* y fue preparado disolviendo los componentes de la Tabla 3.2 en agua bidestilada. Posteriormente, se ajustó el pH de la solución a 7,2 y se hizo pasar por un filtro de 0,22 µm para su esterilización.

Tabla 3.2. Composición del medio HBSS.

Compuesto	Concentración (g/L)
NaCl	8,00
KCl	0,04
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,20
KH ₂ (PO ₄) ₃	0,06
Na ₂ H(PO ₄) ₃	0,50
Glucosa	9,00
Penicilina	0,05
Estreptomicina	0,05

3.2.2.2. Obtención de larvas L1.

Los ratones infectados para el mantenimiento de la cepa de *T. spiralis* se sacrificaron por sobredosis de cloroformo. Tras retirar la piel y las vísceras, se trituró la canal con medio gástrico artificial (250 mL) preparado siguiendo las condiciones de la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013), utilizando una trituradora Moulinex. Se añadieron 100 mL de líquido por cada 10 g de carne. El homogeneizado se dispuso en frascos de plástico con tapón de rosca y se

mantuvo en un agitador de incubación New Brunswick a 37 °C y 200 rpm durante 2 horas (García Rodríguez, 2008).

Tras concluir la digestión, el contenido del frasco se hizo pasar a través de gasas de 24 hilos/cm² y el líquido filtrado se recogió en copas de sedimentación. Después de permanecer un tiempo en el reposo, se retiró el sobrenadante, mientras que el sedimento, conteniendo las larvas, se trasladó a un recipiente con solución fisiológica (García Rodríguez, 2008).

Posteriormente, se realizó el recuento de las larvas, utilizando una cámara de McMaster y un microscopio óptico. Las muestras se recogieron, mediante una pipeta Pasteur, del recipiente con las larvas en solución fisiológica en agitación constante. Se llevó a cabo el recuento de las larvas por celda. Al disponer de 2 celdas en la cámara McMaster, se calculó la media aritmética de los valores en ambas cámaras, siendo el valor obtenido el número de larvas en 0,15 mL (García Rodríguez, 2008).

3.2.2.3. Preparación del ensayo *ex vivo*.

Se comparó la actividad nematocida del extracto SN1-2010 de *A. absinthium*, disuelto a una concentración de 0,1% v/v en una solución formada por DMSO:Tween® 80 (98:2 v/v), con la actividad de una disolución de la microemulsión previamente optimizada en HBSS a la misma concentración que la disolución (0,1% v/v). Al diluirse con HBSS, la composición de la microemulsión se modifica, convirtiéndose en emulsión.

Por otro lado, se preparó una dispersión de los solventes (placebo de la disolución) y de los emulgentes de la microemulsión (placebo de la microemulsión) en HBSS.

Se utilizaron placas de 24 pocillos, disponiendo en cada pocillo 1 mL de cada formulación y 1 mL de una dispersión de larvas L1 de *T. spiralis* en HBSS, con una concentración de 1000 larvas/mL. De este modo, la concentración del extracto se diluyó a 0,05 v/v (Figura 3.14).

Las larvas se incubaron en contacto con la formulación durante 24 horas, a 37 °C, en una atmósfera con 5% de CO₂ (Bolás-Fernández et al., 2004; García Rodríguez, 2008). Pasado este tiempo se elimina mediante pipeta pasteur, de la parte superior de cada pocillo 1 mL del medio, extremando la precaución de no arrastrar larvas en este proceso. Posteriormente, se resuspende el contenido para tomar 0,3 mL de la dispersión resultante

(300 larvas) que fueron administradas a ratones machos Swiss CD1, de 8 – 10 semanas y 20 – 25 g, por medio de una sonda buco gástrica. Los ratones se dividieron en 6 grupos, con 6 ratones por grupo (Figura 3.14). La metodología para el recuento de los parásitos tras la exposición a las formulaciones se ha descrito previamente (Wakelin y Lloyd, 1976). A los 7 días de la infección, los ratones se sacrificaron por sobredosis de cloroformo. A continuación, se realizó una incisión, retirando el intestino delgado, fragmentándolo en secciones de unos 5 cm e incubándolo en 100 mL de una solución de NaCl 0,9% durante 3 horas a 37 °C. La suspensión fue analizada utilizando una lupa binocular, registrando el número de adultos de *T. spiralis* liberados de la mucosa intestinal (Figura 3.14 y Tabla 3.3).

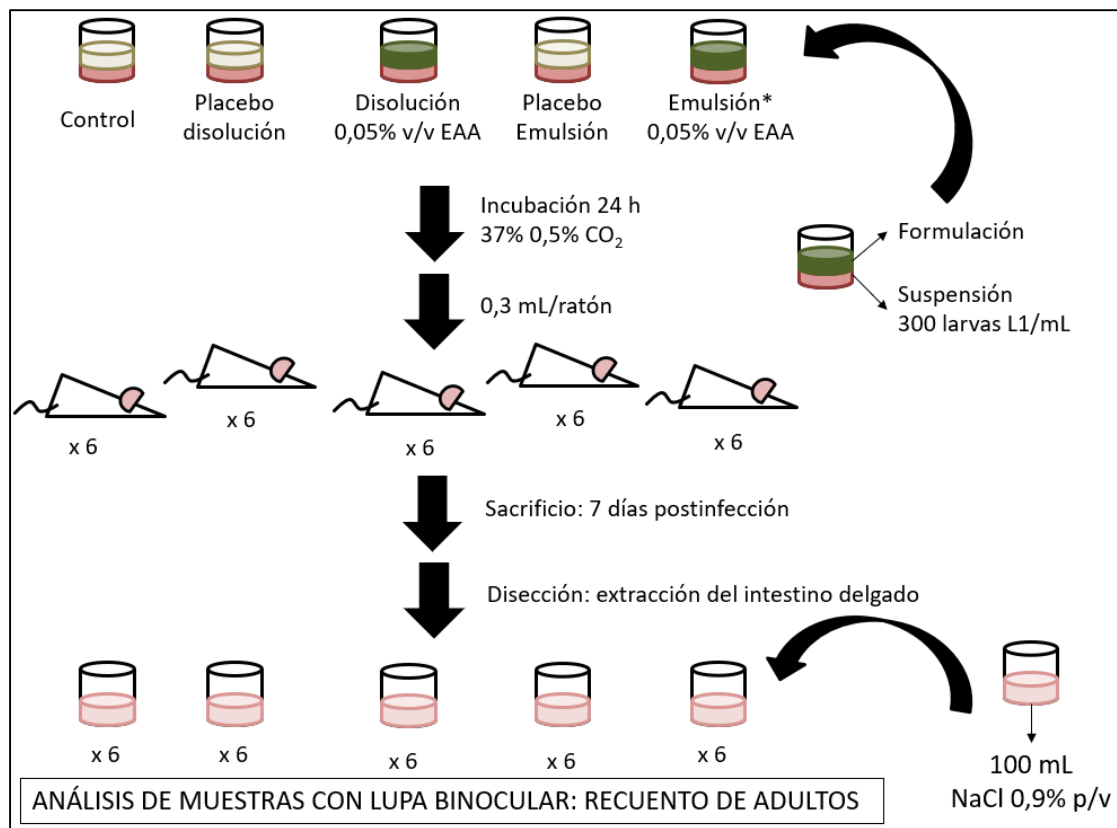


Figura 3.14. Esquema del experimento *ex vivo*. Nota: *Contiene la microemulsión diluida para obtener 0,05% p/v de extracto de *A. absinthium*. Sin embargo, debido a las características de la formulación es posible que no se encuentre en un estado de microemulsión sino de emulsión. Abreviaturas: EAA: extracto de *A. absinthium*; mL: mililitro; NaCl: cloruro sódico.

Tabla 3.3. Composición de las formulaciones utilizadas en el experimento *ex vivo*.

Grupo	Contenido en extracto de <i>A. absinthium</i>	Formulación
Control	-	HBSS
Placebo de la disolución	-	5,00% v/v DMSO:Tween® 80 (98:2 v/v) en HBSS
Disolución	0,05% v/v	5,00% v/v DMSO:Tween® 80 (98:2 v/v) en HBSS
Placebo de la emulsión	-	0,11% v/v Tween® 80:propilenglicol (1,5:1 v/v) + 0,01% de agua destilada en HBSS
Emulsión	0,05% v/v	0,11% v/v Tween® 80: propilenglicol (1.5:1 v/v) + 0,01% de agua destilada en HBSS

Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*.

3.2.3. Desarrollo de una formulación en comprimidos.

3.2.3.1. Inclusión de la microemulsión en un material de sílice.

Con el objetivo de desarrollar una formulación sólida a partir del extracto de *A. absinthium*, la microemulsión previamente optimizada se incorporó a un material poroso de sílice (Syloid® XDP 3150) 1:1,5 p/p con una espátula (Gumaste et al., 2013a). Posteriormente, la mezcla pulverulenta se mantuvo a temperatura estable ($25,0 \pm 0,1$ °C) durante 24 horas para asegurar la absorción completa de la formulación lipídica en el material de sílice.

3.2.3.2. Análisis espectrofotométrico de la microemulsión cargada.

Se comparó la dispersión de la microemulsión en estado semisólido y tras ser cargada en el material de sílice, utilizando un equipo de velocidad de disolución. Para ello, se preparó un estudio de dispersión en 50 mL de agua destilada, utilizando un aparato II de disolución USP (Sotax AT7, Aesch, Switzerland). La temperatura del medio fue 37 °C, y la velocidad de giro de las paletas fue 50 rpm. Se dispuso una muestra de 0,077 g de microemulsión, equivalentes a una cantidad de extracto de 0,023 g, en 50 mL de agua destilada. Por otro lado, se dispusieron 0,013 g de Syloid® XDP 3150 cargado con la microemulsión en proporción 1:1,5 p/p, equivalentes a una cantidad de extracto de 0,015 g, en 50 mL de agua destilada. También se analizó si existían diferencias entre la liberación de la microemulsión en función del pH del medio. Para ello, se analizó la liberación de la misma cantidad de Syloid® XDP 3150 cargado en 50 mL de ácido clorhídrico 0,1 N.

Las muestras se tomaron a los 2 minutos y fueron analizadas mediante un barrido espectrofotométrico entre 200 y 600 nm utilizando un equipo Thermo Fisher AquaMate 8000 (Thermo Fisher, Estados Unidos). Para asegurar la liberación de la microemulsión, las muestras procedentes del Syloid® XDP 3150 cargado fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4.500 rpm, utilizando una centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Alemania) antes de ser analizadas.

3.2.3.3. Estudio de las cinéticas de liberación a partir del material de sílice.

La cinética de liberación a partir del material de sílice, se analizó mediante un estudio de dispersión, utilizando un aparato II de disolución USP (Sotax AT7), en 250 mL de agua destilada. Las condiciones fueron 37 °C, y la velocidad de giro de las paletas fue de 75 rpm. El material de sílice cargado con la microemulsión fue incorporado en cápsulas de gelatina dura de tamaño doble cero, en dosis de 0,640 g.

Se tomaron muestras de 5 mL a los siguientes tiempos: 2, 5, 8, 12 y 20 minutos. Las muestras fueron diluidas en una proporción 1:14 v/v con agua destilada y posteriormente analizadas en un rango de longitudes de onda entre 200 y 300 nm utilizando un espectrofotómetro Thermo Fisher AquaMate 8000.

Seguidamente, se realizó un estudio de velocidad de disolución en condiciones similares a las anteriores, a los siguientes tiempos: 0, 1, 4, 7, 13, 16, 20 y 30 minutos. Tras su dilución, las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 220 nm. Estas medidas se realizaron por triplicado. La absorbancia máxima alcanzada al final del estudio se ha asumido como el 100% de absorbancia, de forma que las medidas del ensayo se han estimado como absorbancia relativa.

3.2.3.4. Estudio de estabilidad.

El material de sílice Syloid® XDP 3051 cargado con la microemulsión preparada en proporción 1:1,5 p/p se mantuvo en condiciones de reposición a 25,0±0,1 °C y 60% HR. Las muestras de la mezcla pulverulenta se tomaron a los 15 y 90 días desde la preparación.

Seguidamente, la cinética de liberación de la microemulsión a partir de la mezcla pulverulenta fue analizada mediante un estudio de velocidad de disolución similar al descrito anteriormente. La mezcla pulverulenta se dosificó en cápsulas de gelatina dura

de tamaño doble cero, en dosis de 0,640 g. Se utilizó un aparato II de disolución USP (Sotax AT7), en 250 mL de agua destilada. Las condiciones fueron 37 °C, y la velocidad de giro de las paletas fue 75 rpm.

Se tomaron muestras de 5 mL a los siguientes tiempos: 0, 1, 4, 7, 13, 16, 20 y 30 minutos, que se diluyeron en una proporción 1:14 v/v con agua. Tras su dilución, las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 220 nm. Estas medidas se realizaron por triplicado. La absorbancia máxima alcanzada al final del estudio a tiempo cero se ha asumido como el 100% de absorbancia, de forma que las medidas de las muestras tras el periodo de reposición se han definido como absorbancia relativa.

3.2.3.5. Comparativa de las cinéticas de liberación de la microemulsión.

Parámetros modelísticos

Diferentes modelos cinéticos de liberación se han ajustado a los resultados de absorbancia, con el objetivo de definir las características de la liberación de la microemulsión semisólida previamente cargada en el material de sílice. Asimismo, se ha comparado la cinética de liberación a tiempo cero y tras un periodo de reposición de 15 y 90 días.

Los modelos cinéticos analizados se indican en la Tabla 1.4. Para conocer la bondad del ajuste de cada modelo a los datos experimentales, se calcularon el coeficiente de determinación (R^2) y de determinación ajustado ($R^2_{ajustado}$). El coeficiente de determinación se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$R^2 = \frac{\sigma^2(X,Y)}{\sigma^2(X)\sigma^2(Y)} \quad (\text{Ec. 45}),$$

Siendo $\sigma^2(X, Y)$ la covarianza de las variables X e Y de la regresión y $\sigma^2(X)$ y $\sigma^2(Y)$, las varianzas de las variables X e Y, respectivamente. Los valores de R^2 varían entre 0 y 1, de forma que los modelos cinéticos que mejor se ajustan a los datos experimentales presentan R^2 mayores. A partir de R^2 , se estimó el $R^2_{ajustado}$, siguiendo la siguiente expresión:

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)}(1 - R^2) \quad (\text{Ec. 46}),$$

Siendo n el número de puntos de la disolución y p el número de parámetros del modelo. De este modo, aunque R^2 suele aumentar al incrementar el número de parámetros en el modelo, R^2 ajustado puede disminuir en función de la significación del nuevo parámetro. Por tanto, R^2 ajustado da un valor más representativo de la bondad del ajuste respecto de R^2 (Costa y Sousa Lobo, 2001). Al igual que R^2 , la escala de valores del R^2 ajustado varía entre 0 y 1, de forma que valores altos implican un mejor ajuste del modelo.

Parámetros amodelísticos

También se estimaron los parámetros amodelísticos tiempo medio de disolución (TMD) y la eficacia de disolución de los comprimidos (ED), utilizando las siguientes expresiones:

$$TMD = \frac{AUC_0^t}{Q_{\infty} t} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 47}),$$

$$ED = \frac{Q_{\infty} t \cdot AUC_0^t}{Q_{\infty}} \quad (\text{Ec. 48}),$$

Ambos parámetros han sido calculados a los 30 minutos, son inversamente proporcionales y se refieren a la cantidad de microemulsión liberada al medio. Se estimaron las medias, las desviaciones estándar y los intervalos de confianza con un nivel de significación del 5% para cada condición.

3.2.3.6. Estudio de las propiedades de flujo del material de sílice.

El material de sílice vacío y cargado con la microemulsión fue analizado en función de sus propiedades de flujo, según los procedimientos indicados en la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013). La densidad aparente (ρ_b) y compactada (ρ_t) fueron determinadas utilizando un equipo analizador de propiedades de flujo Jelstav 2003 (J. Engelsmann AG, Ludwigshafen am Rhein, Alemania). Los índices de compresibilidad y los índices de Hausner fueron estimados utilizando las siguientes ecuaciones (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013):

$$\text{Índice de compresibilidad} = \frac{100(\rho_t - \rho_b)}{\rho_t} \quad (\text{Ec. 49})$$

$$\text{Índice de Hausner} = \frac{\rho_t}{\rho_b} \quad (\text{Ec. 50})$$

Para calcular el ángulo de reposo con la emulsión, tanto el material de sílice vacío y como cargado con la microemulsión se cargado hicieron pasar a través de un embudo situado a 100 mm de distancia de una superficie plana. El embudo presentaba una altura de 220 mm y un diámetro de 212,5 mm, mientras el cuello tenía una altura de 122 mm de largo y 12 mm de diámetro. El cono formado por la mezcla pulverulenta fue medido, calculando el ángulo de reposo utilizando la siguiente ecuación (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013):

$$\tan(\alpha) = \frac{\text{altura}}{0,5 \text{ base}} \quad (\text{Ec. 51})$$

Estos experimentos se realizaron por triplicado.

3.2.3.7. Selección del aglomerante, de su contenido y de la fuerza de compresión.

Se analizó la eficacia de la PVP y del almidón pregelatinizado como aglutinantes en seco. En base a los resultados de otros estudios (Choudhari et al., 2014b), se prepararon dos mezclas pulverulentas: una formada por 10% p/p de PVP y la otra, con 10% p/p de almidón pregelatinizado (Tabla 3.4). Los componentes de la mezcla fueron combinados utilizando una mezcladora Turbula® mixer T2F (Willy A. Bachofen AG Maschinenfabric, Suiza). Posteriormente, las mezclas se hicieron pasar a través de un tamiz con un tamaño de 0,25 mm.

Tabla 3.4. Composición de las formulaciones analizadas.

Componente	Formulación basada en polivinilpirrolidona (% p/p)	Formulación basada en almidón pregelatinizado (% p/p)
Syloid® XDP: microemulsión (1:1.5)	40,0	40,0
Celulosa microcristalina	45,5	45,5
Aglomerante en seco	10,0	10,0
Croscarmelosa	3,0	3,0
Syloid® 244	1,0	1,0
Estearato magnésico	0,5	0,5

Los comprimidos se prepararon de manera discontinua por compresión directa, utilizando una máquina de análisis de materiales universal EZ20 (Lloyd Instruments Ltd, Bognor Regis, Reino Unido) (Figura 3.15A). Las mezclas pulverulentas de las formulaciones fueron incorporadas a la matriz que se muestra en la Figura 3.15B y

compactadas con un punzón redondo plano de 9 mm de diámetro. Las fuerzas de compresión fueron 10 kN, 12 kN y 15 kN.

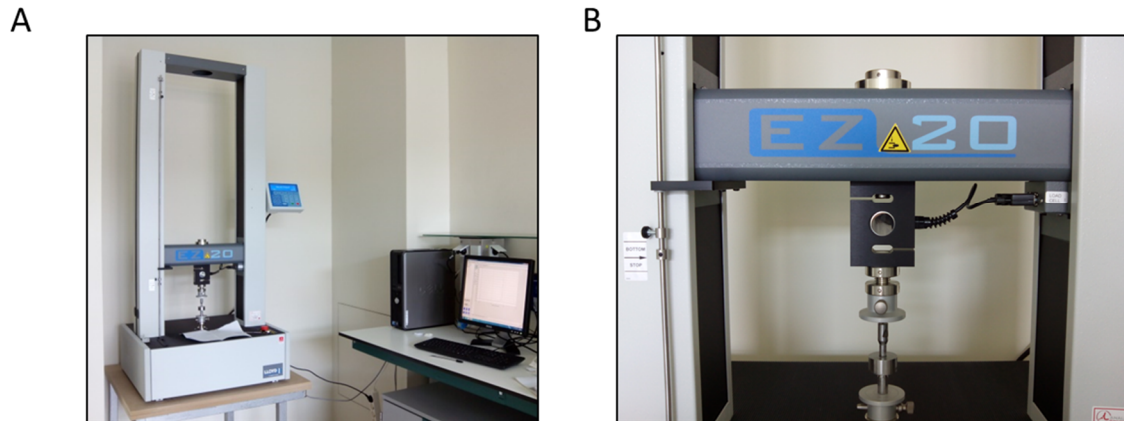


Figura 3.15. Aspecto de la máquina de análisis de materiales (A) y detalle del punzón (B).

Los comprimidos se analizaron en función de su fuerza tensil, utilizando la ecuación de Fell y Newton (Fell y Newton, 1970):

$$\sigma = \frac{2F}{\pi DH} \quad (\text{Ec. 52})$$

En donde σ es la fuerza tensil, F es la fuerza de rotura y D y H son el diámetro y el grosor del comprimido, respectivamente. Al considerar el diámetro y la altura de los comprimidos, la medida de la fuerza tensil permite comparar directamente la resistencia a la fractura de las diferentes formulaciones. La fuerza tensil se determinó a partir de la fuerza de aplastamiento diametral, utilizando un fracturómetro PTB411 (Pharmatest, Hainburg, Alemania). El diámetro y el grosor de los comprimidos se midieron utilizando un calibre.

El aglomerante con mejores resultados (fuerza tensil > 1 MPa (Chen et al., 2016)) fue incorporado en nuevas formulaciones de comprimidos, a diferentes concentraciones (10% p/p, 15% p/p o 26,5% p/p) y a dos fuerzas de compresión distintas (12 kN o 15 kN) (Tabla 3.5). Los estudios se realizaron en 10 comprimidos de cada formulación.

Tabla 3.5. Composición de las formulaciones analizadas.

Componente	Formulación 10% p/p (% p/p)	Formulación 15% p/p (% p/p)	Formulación 26,5% p/p (% p/p)
Syloid® XDP: microemulsión (1:1.5)	40,0	40,0	40,0
Celulosa microcristalina	45,5	40,5	30,0
Aglomerante en seco	10,0	15,0	26,5
Croscarmelosa	3,0	3,0	3,0
Syloid® 244	1,0	1,0	-
Estearato magnésico	0,5	0,5	0,5

3.2.3.8. Optimización de una formulación en comprimidos.

Al igual que la microemulsión, la formulación en comprimidos se optimizó utilizando un diseño de mezclas D-optimal. Las variables independientes fueron la cantidad de material de sílice cargado con la microemulsión y el contenido en otros excipientes, que se establecieron a diferentes rangos de concentración (Rowe, 2009) (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Límites máximos y mínimos para cada componente de la formulación.

Componente	Mínimo (% p/p)	Máximo (% p/p)
Syloid® XDP: microemulsión (1:1,5)	32	60
Celulosa microcristalina	20	40
Polivinilpirrolidona	0	20
Croscarmelosa	0	6
Syloid® 244	0	1
Estearato magnésico	0,5	1

Se estimaron 16 experimentos diferentes o combinaciones de cada uno de los 6 componentes, hasta un contenido total del 100%, utilizando un modelo lineal. Este es un modelo simplificado que pretende cuantificar el efecto de los excipientes en la variable de estudio.

Cada experimento fue preparado mezclando las cantidades indicadas de cada componente. Las mezclas pulverulentas fueron analizadas de acuerdo a sus propiedades de flujo. Las densidades aparente y compactada fueron medidas de forma similar a experimentos previos. Entonces, las mezclas fueron compactadas por compresión directa, utilizando un equipo EZ20 (Lloyd Instruments Ltd, Bognor Regis, Reino Unido), con un punzón redondo plano de 9 mm de diámetro, aplicando una fuerza de 12 kN.

3.2.4.4.1. Caracterización de experimentos: fuerza tensil y tiempo de desintegración.

Debido a la naturaleza oleosa de la microemulsión y a las malas propiedades de compresibilidad del material de sílice, seleccionamos la fuerza tensil y el tiempo de desintegración como las variables respuesta principales para optimizar la nueva formulación, ya que muestran las interacciones entre las partículas y las características técnicas de los comprimidos (Kachrimanis et al., 2003; Tye et al., 2005). Los resultados se analizaron en 10 comprimidos, considerando el valor mínimo, máximo y el valor medio.

Los estudios de desintegración se realizaron utilizando un equipo de desintegración Vanderkamp 71b-174B-6 (Vankel Industries, INC., Chatham, Ontario, Canadá) con 900 mL de agua destilada a 37 °C, según las condiciones establecidas por la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013). Los estudios se realizaron por considerando el tiempo de desintegración del último comprimido por cada conjunto de 6 comprimidos analizados procedentes de la misma formulación. Los resultados se estimaron en minutos.

3.2.4.4.3. Condiciones de optimización. Selección de la formulación optimizada.

El software Design Expert[®] permitió evaluar los resultados y desarrollar los modelos de fuerza tensil y de tiempo de desintegración. Se llevó a cabo un proceso de optimización, con el objetivo de incrementar el contenido en el extracto de *A. absinthium*, mejorando las propiedades del comprimido, con la maximización en la fuerza tensil y la minimización del tiempo de desintegración. La maximización consiste en definir el área para el cual la fuerza tensil de los comprimidos alcanza valores máximos, mientras que la minimización del tiempo de desintegración es el proceso por el que se estiman las condiciones del proceso para las cuales se obtienen valores mínimos (Myers et al., 2016).

De este modo, se procuró incrementar el contenido del extracto de *A. absinthium* en la formulación optimizada y alcanzar un compromiso entre ambas variables, relativas a las características farmacotécnicas de los comprimidos. Los umbrales inferior y superior de las diferentes variables se muestran en Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Límites máximo y mínimo para la optimización de la formulación en comprimidos.

Componente	Mínimo	Máximo
Syloid® XDP: microemulsión (1:1.5) (% p/p)	48,078	60,000
Celulosa microcristalina (% p/p)	20,716	40,000
Polinivilpirrolidona (% p/p)	0,000	20,000
Croscarmelosa (% p/p)	0,000	6,000
Syloid® 244 (% p/p)	0,078	0,999
Estearato magnésico (% p/p)	0,562	1,000
Fuerza tensil (MPa)	0,388	2,703
Tiempo de desintegración (min)	0,2	9,217

La formulación optimizada fue posteriormente analizada en el laboratorio y sus resultados se compararon con los resultados teóricos estimados por el modelo. Se calculó el error estándar relativo (EER), de forma similar a otros estudios (Malakar et al., 2012; Mohamad Zen et al., 2015), con la siguiente ecuación:

$$EER(\%) = \left| \frac{\text{Valor real} - \text{Valor predicho}}{\text{Valor predicho}} \right| * 100 \quad (\text{Ec. 53})$$

La formulación optimizada fue seleccionada como aquella con la mayor similitud con los resultados estimados estadísticamente. Estos cálculos se realizaron utilizando el software Microsoft Excel 2010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESARROLLO DE UNA MICROEMULSIÓN

Debido a la escasa disponibilidad del extracto de *A. absinthium*, los primeros ensayos de selección de emulgentes para el diseño de una microemulsión se han realizado con aceite de oliva, lo que ha permitido comparar el comportamiento de ambas fases oleosas.

4.1.1. Selección de emulgentes

4.1.1.1. Fase oleosa: aceite de oliva

En este apartado, la selección de emulgentes se divide en dos partes principales. En la primera etapa, se seleccionó la combinación de emulgente y coemulgente con una composición conocida de fase oleosa que permitió incorporar la mayor cantidad posible de agua. En la segunda etapa, se eligió la proporción emulgente:coemulgente que permite el mayor área de microemulsión en los diagramas pseudoternarios.

Los resultados de la primera etapa, utilizando Labrasol® y dos coemulgentes (Lauroglycol® y Plurol Oleique®), se muestran a continuación en los diagramas pseudoternarios. Las mezclas obtenidas durante la valoración con agua se presentan en forma de cuadrados negros y entre ellas, aquellas marcadas en gris fueron fotografiadas durante su valoración. Se observa que las muestras pertenecientes al área de microemulsión (en amarillo pálido) tienen una apariencia dorada y transparente, mientras que el resto de formulaciones presentan un aspecto lechoso y blanquecino, con baja estabilidad.

Los diagramas ternarios que representan el comportamiento de las mezclas formadas por la combinación de Labrasol® y Lauroglycol® se muestran en la Figura 4.1. Se observa que el área de microemulsión es similar en la proporción 4:1 p/p, respecto del obtenido en la proporción 1:1 p/p. Ambas mezclas de emulgentes permiten incorporar hasta un 40% p/p de aceite de oliva, aunque la máxima cantidad de agua que se puede incorporar al sistema es inferior al 5% p/p.

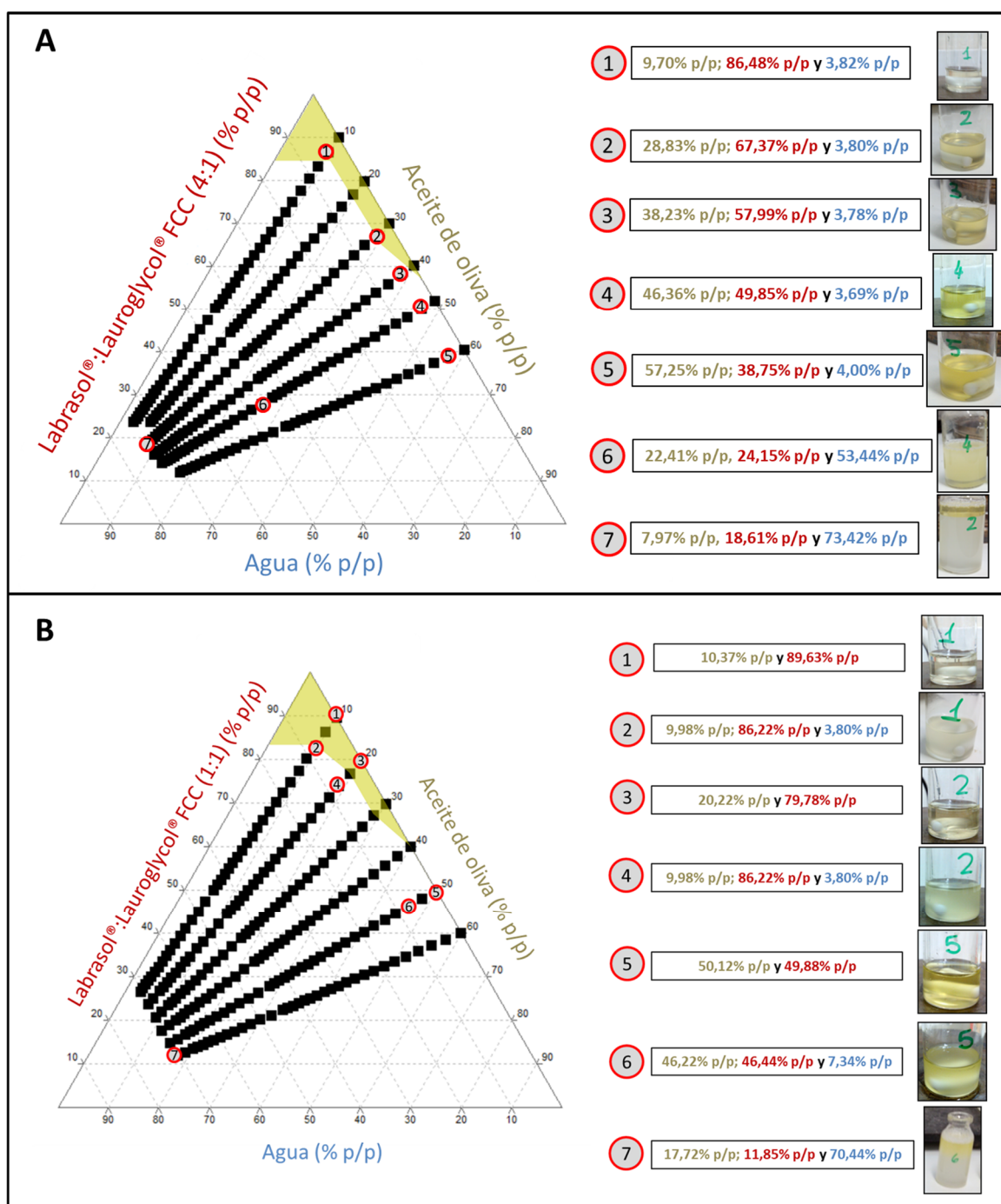
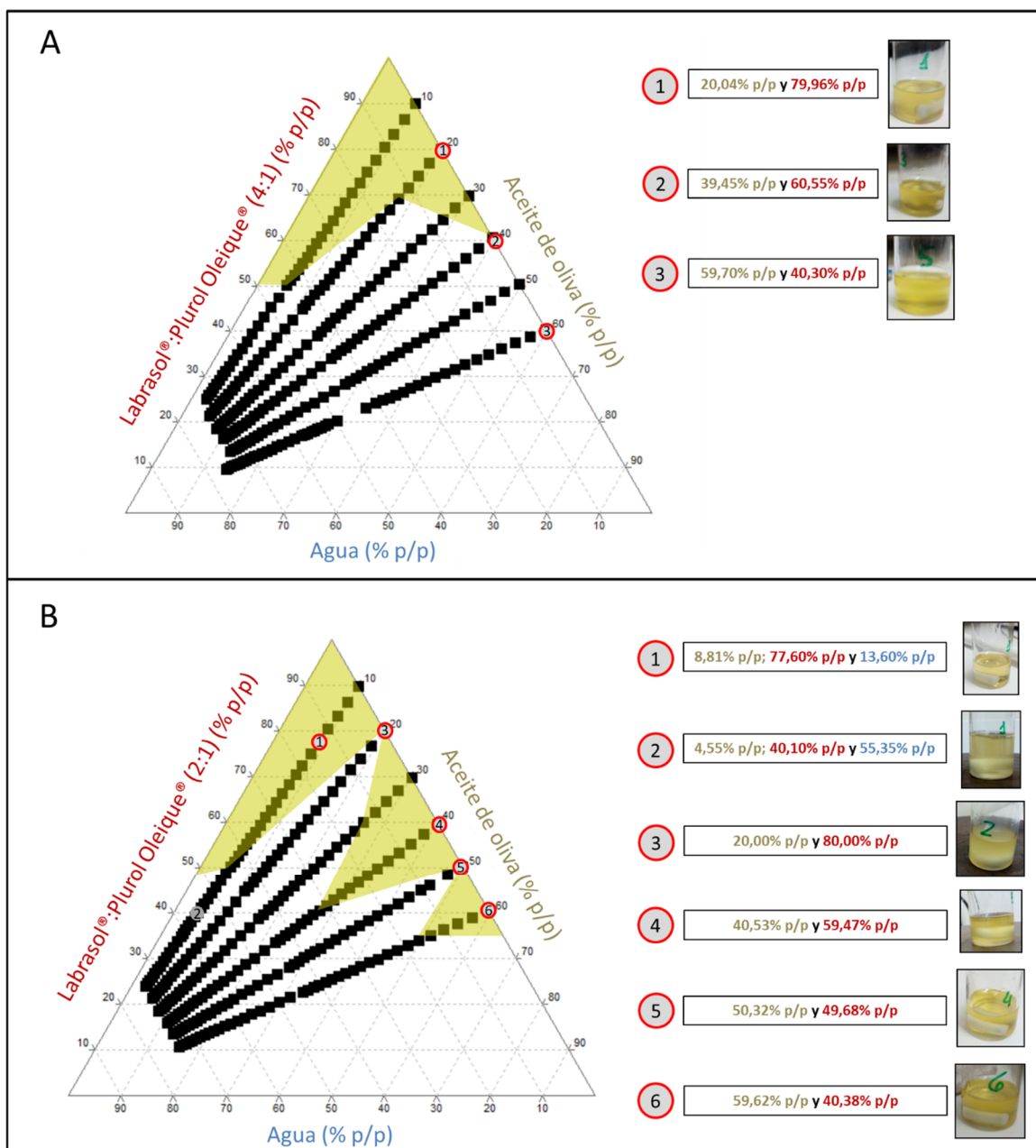


Figura 4.1. Diagramas pseudoternarios de las mezclas de Labrasol® y Lauroglycol® en proporciones 4:1 (A) y 1:1 (B).

Los diagramas ternarios que presentan las formulaciones formadas por Labrasol® y Plurol Oleique® (4:1 p/p, 2:1 p/p y 1:1 p/p) se muestran en la Figura 4.2. Se observa que las formulaciones formadas por la mezcla de Labrasol® y Plurol Oleique® son más blanquecinas y tienen una consistencia mayor respecto de las formuladas con el coemulgente Lauroglycol®. Asimismo, las áreas de microemulsión son mayores,

especialmente en la proporción 2:1. Se observa que la combinación de Labrasol® y Plurol Oleique® 2:1 p/p permite disolver hasta el 60% p/p de aceite de oliva, en formulaciones que incorporan al menos un 10% p/p de agua.



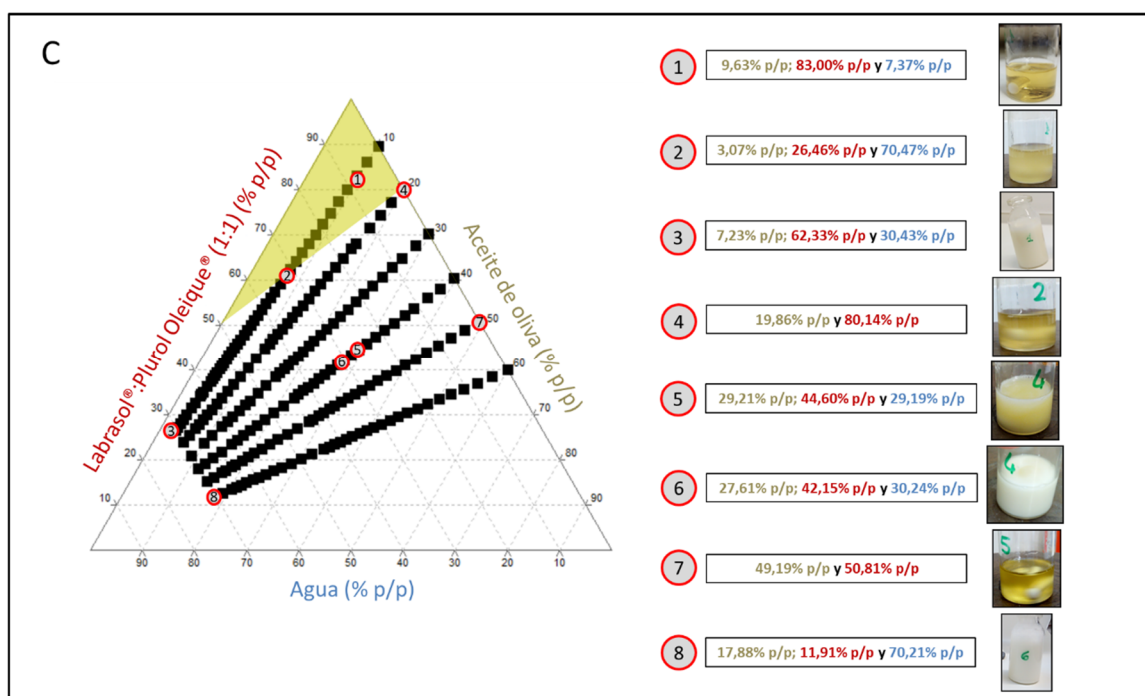


Figura 4.2. Diagramas pseudoternarios de las mezclas de Labrasol® y Plurol Oleique® en proporciones 4:1 (A), 2:1 (B) y 1:1 (C).

4.1.1.2. Fase oleosa: extracto de *A. absinthium*

Al igual que en la formulación del aceite de oliva, la selección de emulgentes y coemulgentes para la formulación del extracto de *A. absinthium* se realizó en 2 etapas. En la primera, se analizó la cantidad máxima de agua incorporada a diferentes sistemas, formados por uno de los dos emulgentes (Labrasol® o Tween® 80) y alguno de los 3 coemulgentes (propilenglicol, Lauroglycol® o Plurol Oleique®), en proporción 1:1 p/p. La combinación de emulgentes capaz de incorporar la mayor cantidad posible de fase acuosa fue analizada en una segunda etapa, considerando diferentes proporciones de emulgentes y coemulgentes.

Los resultados de la primera etapa se muestran en la Figura 4.3. El diagrama muestra la cantidad máxima de agua incorporada a cada combinación de emulgentes:coemulgentes. Se observa que en general, las formulaciones que incorporan como emulgentes Tween® 80 permiten añadir una mayor cantidad de agua respecto de las constituidas por Labrasol®. En cuanto a los coemulgentes, se observó que propilenglicol permite incorporar una mayor cantidad de fase acuosa respecto de las formulaciones que incluyen Lauroglycol® y Plurol Oleique®. La combinación formada por Tween® 80 y propilenglicol permitió incorporar la mayor cantidad de agua manteniendo un aspecto transparente (87,86% p/p).

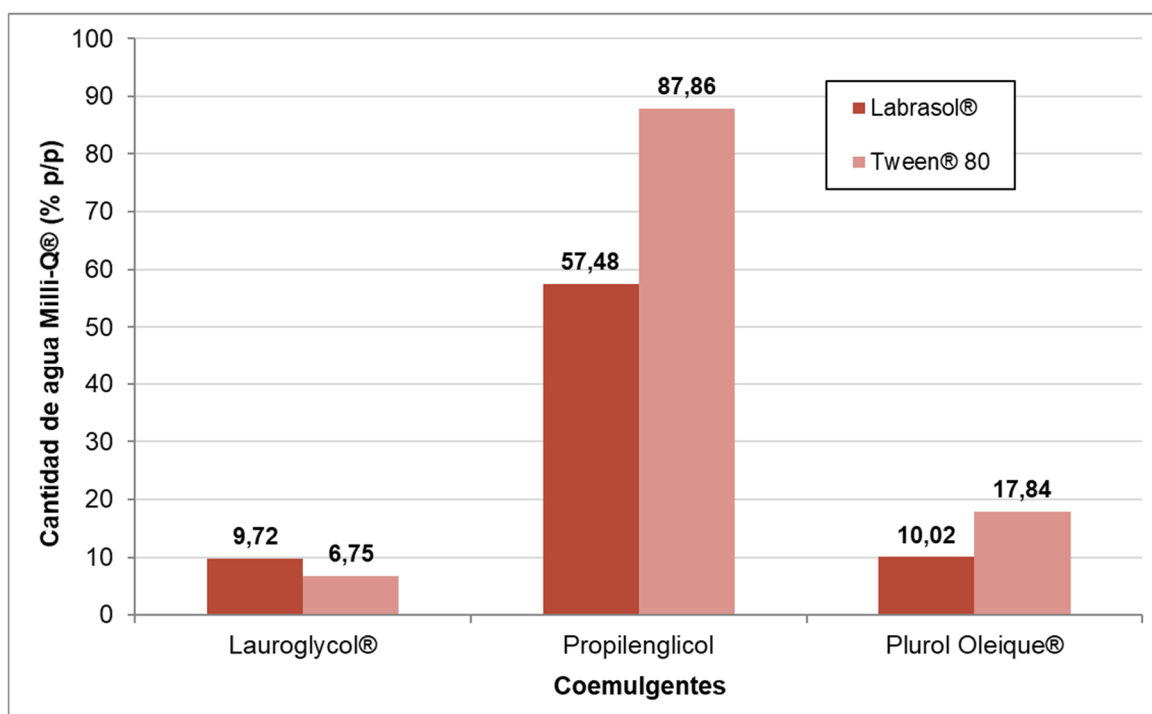


Figura 4.3. Relación entre las cantidades máximas de agua incorporada en las diferentes mezclas de emulgentes y coemulgentes.

Asimismo, se observaron cambios en el color, la consistencia y la estabilidad de las formulaciones tras su dilución con agua. Con una composición similar, las formulaciones constituidas por el emulgente Labrasol® tienen un color más oscuro que las formadas por Tween® 80 (Figura 4.4). Las combinaciones Labrasol®: Lauroglycol® y Labrasol®:propilenglicol dieron lugar a formulaciones de baja estabilidad, con la coalescencia de la fase oleosa (verde oscuro) en la superficie. Por su parte, la formulación constituida por Labrasol® y Plurol Oleique® presentó un aspecto homogéneo, aunque con una consistencia mayor que las anteriores.

En cuanto a las formulaciones constituidas por Tween® 80, aquella formada por Lauroglycol® presenta un aspecto opaco, blanquecino y lechoso, característico de una emulsión. La formulación con propilenglicol se diluyó hasta el 80%, manteniendo el aspecto transparente que se observa en la imagen. Finalmente, la formulación formada por Tween® 80 y Plurol Oleique® presentó un aspecto homogéneo, con una consistencia ligeramente superior a las dos anteriores. Estos resultados permitieron concluir que Tween® 80 y propilenglicol forman mezclas visualmente compatibles con el extracto de *A. absinthium*, para futuras investigaciones.

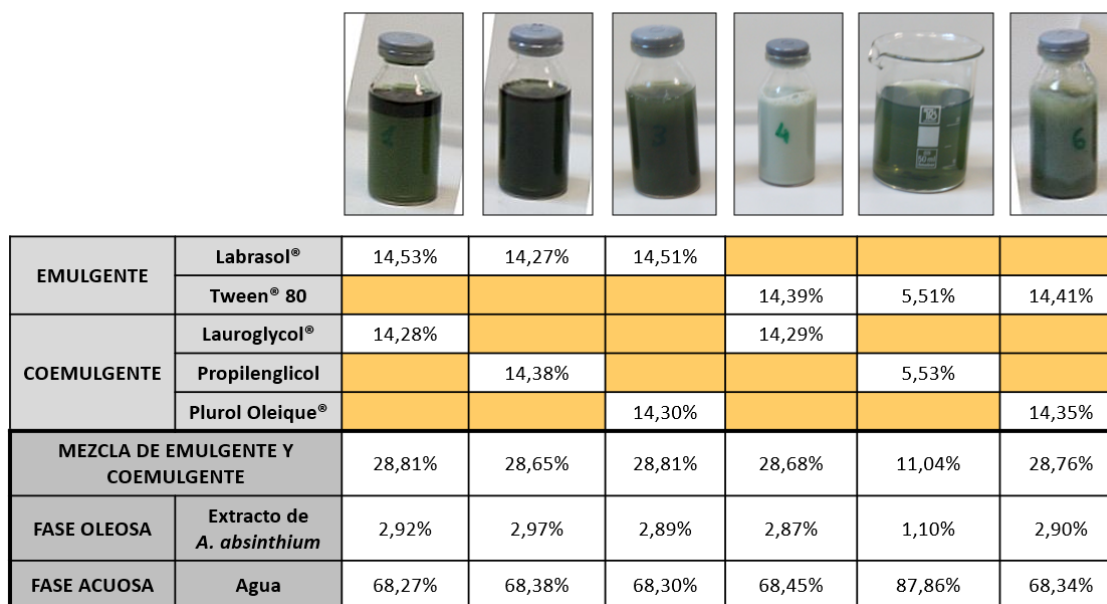
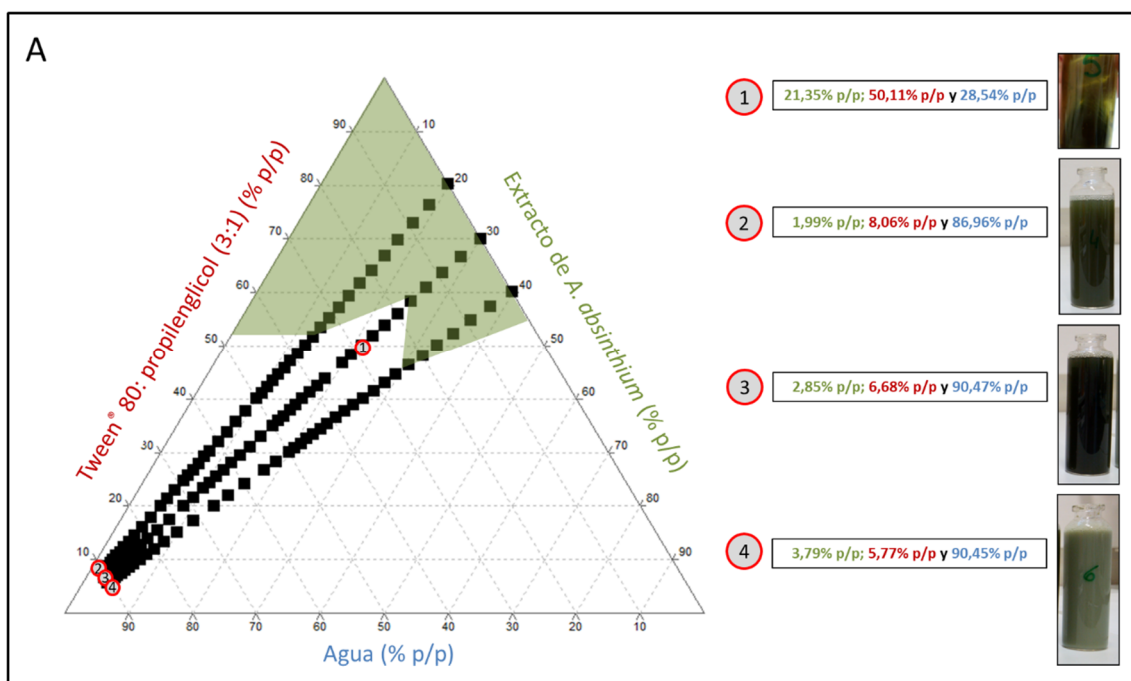
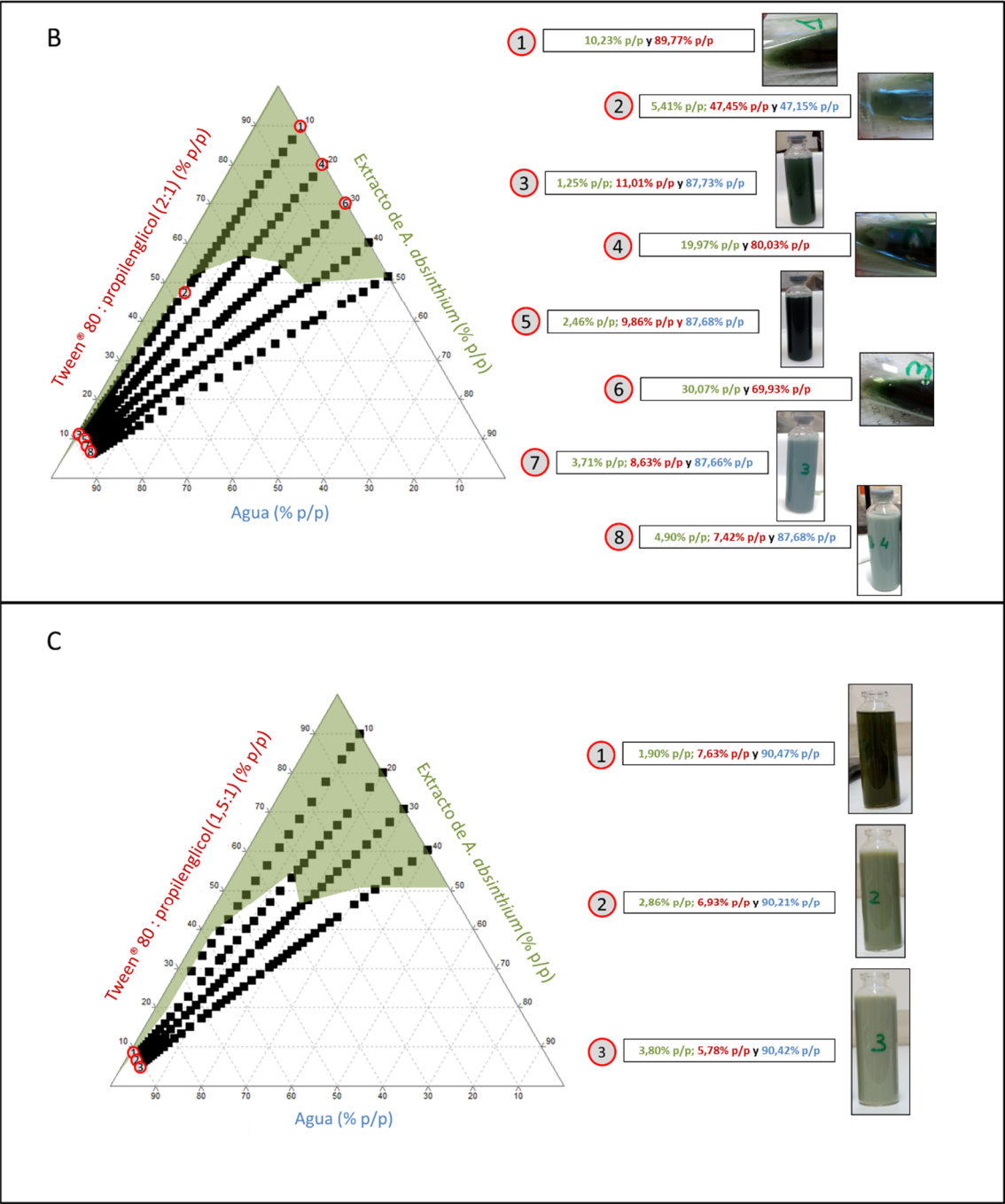


Figura 4.4. Apariencia y composición (% p/p) de las formulaciones con diferentes mezclas de emulgentes y coemulgentes.

En la segunda etapa de la selección de emulgentes, se desarrollaron 4 diagramas pseudoternarios utilizando Tween® 80 y propilenglicol en las proporciones 3:1, 2:1, 1.5:1 y 1:1 p/p. Los resultados obtenidos en estas combinaciones de emulgente y coemulgente se muestran en la Figura 4.5.





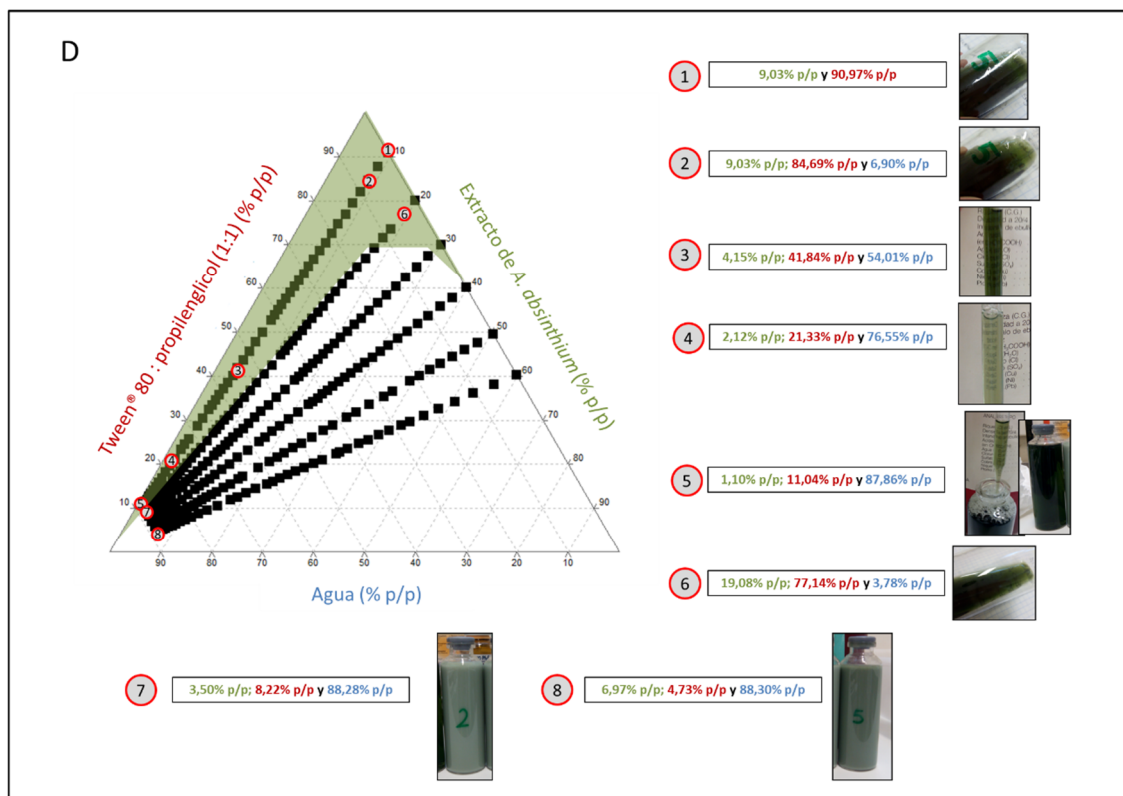


Figura 4.5. Diagramas pseudoternarios de mezclas formadas por Tween® 80 y propilenglicol: 3:1 p/p (A), 2:1 p/p (B), 1.5:1 p/p (C) y 1:1 p/p (D).

La mezcla formada por Tween® 80 y propilenglicol en proporción 3:1 p/p permite formar microemulsiones que incluyen hasta un 40% p/p de extracto de *A. absinthium* y más del 40% p/p de agua. Las formulaciones procedentes de las líneas de dilución iniciadas con 20% p/p y 30% p/p de extracto de *A. absinthium* adquieren un aspecto turbio a altas concentraciones de fase acuosa (86,96% p/p y 90,47% p/p). Sin embargo, la línea de dilución del 40% p/p adquiere un aspecto blanquecino y lechoso, indicativo de la formación de un sistema heterogéneo de dos fases (Figura 4.5A).

También se han observado que las mezclas formadas por Tween® 80 y propilenglicol en proporción 2:1 p/p permiten formar microemulsiones con hasta un 50% p/p de extracto de *A. absinthium* y permiten incorporar una mayor cantidad de agua respecto de las mezclas 3:1 p/p. Sin embargo, el aspecto lechoso de las formulaciones se observa ya en la línea de dilución iniciada con 30% p/p de extracto de *A. absinthium* (Figura 4.5B).

El diagrama ternario de Tween® 80 y propilenglicol 1.5:1 p/p muestra un área de microemulsión que alcanza hasta un 50% p/p de extracto de *A. absinthium*. Las formulaciones permiten incorporar una mayor cantidad de agua respecto de los sistemas

anteriores. Se observa que las formulaciones de la línea de dilución iniciada con un 10% p/p de fase oleosa se mantiene transparentes, hasta la incorporación de 87,73% p/p de agua. Las líneas de dilución restantes permiten la incorporación de una mayor cantidad de fase acuosa sin mostrar turbidez (30% - 50% p/p), aunque sus formulaciones acaban presentando un aspecto lechoso al incorporar mayores cantidades de agua (>50% p/p) (Figura 4.5C).

Finalmente, el diagrama formado por Tween[®] 80 y propilenglicol en proporción 1:1 p/p presenta una menor área de microemulsión respecto de los anteriores y permite formar microemulsiones con hasta 30% p/p de extracto de *A. absinthium*. Sin embargo, las formulaciones pertenecientes a la línea de dilución iniciada con 20% p/p de fase oleosa muestran turbidez al incorporar un 13,65% p/p de agua (Figura 4.5D).

Los resultados obtenidos tras la comparación de los diagramas ternarios formados por aceite de oliva y extracto de *A. absinthium* permiten conocer la compatibilidad química entre los componentes del sistema. Además, el aspecto de las formulaciones varía ampliamente al modificar ligeramente la composición de la formulación. De este modo, líneas de dilución contiguas, cuyas formulaciones acaban presentando concentraciones similares tras su dilución, presentan aspectos totalmente diferentes. La formación de estos sistemas está en consonancia con los diagramas de Winsor, que muestran la formación de un sistema bifásico en la parte inferior del diagrama, en donde las concentraciones de emulgente son menores (Birdi, 2016; Lawrence y Rees, 2012; Rakshit y Moulik, 2008; Winsor, 1948; Xavier-Junior et al., 2017) (Figura 1.14).

4.1.1.3. Comparativa y discusión.

A partir de los diagramas anteriores, se estimaron las áreas de microemulsión de las diferentes combinaciones de emulgentes y coemulgentes. Las áreas de microemulsión de las combinaciones con aceite de oliva variaron entre 4,61% y 24,87% (Tabla 4.1). Se observa que las formulaciones con Plurol Oleique[®] muestran una mayor área de microemulsión respecto de la registrada en las combinaciones con Lauroglycol[®]. Estos resultados están relacionados con la mayor compatibilidad química entre el aceite de oliva y Plurol Oleique[®], ya que el primero está formado por al menos un 51% p/p de ácido oleico (Rondanini et al., 2011) y Plurol Oleique[®] contiene poliglicol-6 dioleato, un derivado de este ácido graso (Gattefosse, 2011b) (Figura 3.4). Sin embargo, Lauroglycol[®]

está formado por monolaurato de propilenglicol, con un carácter más lipófilo (HLB=4) respecto a Plurol Oleique® (HLB=6).

Tabla 4.1. Relación entre el valor de HLB y el área de microemulsión de cada mezcla.

Microemulsiones de aceite de oliva				
Emulgente	Coemulgente	Proporción (X:1)	HLB calculado	Área de microemulsión (%)
Labrasol®	Plurol Oleique®	4	12,4	15,69
		2	11,3	24,87
		1	10,0	10,52
	Lauroglycol®	4	12,0	4,61
		1	9,0	5,33
Microemulsión del extracto de <i>A. absinthium</i>				
Emulgente	Coemulgente	Proporción (X:1)	HLB calculado	Área de microemulsión (%)
Tween® 80	propilenglicol	3	13,47	25,44
		2	12,97	28,25
		1,5	12,56	30,80
		1	11,95	22,84

También se han estimado los valores de HLB de las mezclas de emulgentes y coemulgentes, que varían entre 9,0 y 12,4 unidades. Sin embargo, las variaciones en el valor de HLB no se están relacionadas con la extensión del área de microemulsión. Así, aunque el HLB de la mezcla Labrasol®:Plurol Oleique (4:1 p/p) es similar al estimado para la combinación de Labrasol®: Lauroglycol® (4:1 p/p), el área de microemulsión de la primera triplica el valor alcanzado con la segunda combinación (4,61 vs 15,69, respectivamente) (Tabla 4.1).

Las mezclas formadas por el extracto de *A. absinthium* presentaron áreas de microemulsión más amplias (rango entre 22,84% y 30,80%) respecto de las registradas en las combinaciones con aceite de oliva (Tabla 4.1). Estos resultados pueden deberse a la mayor compatibilidad química entre la fase oleosa y los emulgentes incluidos en la formulación. El extracto de *A. absinthium* está formado por moléculas mono y diterpénicas que son más compatibles con coemulgentes polares y de pequeño peso molecular, como el propilenglicol (HLB=8,9). En consecuencia, éste se convierte en un candidato adecuado para ser el coemulgente más compatible. Estas conclusiones son similares a las obtenidas previamente por Djekic et al., quienes concluyeron que las interacciones entre los principios activos y los emulgentes de una microemulsión pueden mejorar la solubilidad de las fases oleosa y acuosa, facilitando la formación de

microemulsiones (Djekic y Primorac, 2008). Por tanto, la determinación del área de microemulsión utilizando el método de valoración constituye un abordaje adecuado para el desarrollo de microemulsiones.

Como se ha comentado anteriormente, la mezcla formada por Tween[®] 80 y propilenglicol en proporción 1:1 p/p dio lugar a microemulsiones con hasta un 20% p/p de extracto de *A. absinthium*, mientras que mayores concentraciones de la fase oleosa dieron lugar a emulsiones turbias o blanquecinas de baja estabilidad. Por tanto, una mayor concentración del emulgente permitió obtener mayores áreas de microemulsión. La mayor área de microemulsión (30,80%) se registró en la mezcla formada por una proporción 1,5:1 p/p, que implica una mayor compatibilidad química (Tabla 4.1). Por tanto, esta combinación se utilizó en los experimentos posteriores para diseñar una formulación optimizada del extracto de *A. absinthium*.

4.1.2. Caracterización de una línea de dilución.

4.1.2.1. Viscosidad

Se analizó la línea de dilución correspondiente a diluir una formulación con 10% p/p de extracto de *A. absinthium* en una mezcla formada por Tween[®] 80 y propilenglicol (1,5:1 p/p) a 25, 30, 37, 40, 50 y 60 °C. Los resultados de los estudios de viscosidad a 25 °C, con velocidades de cizalla de entre 1 y 20 s⁻¹, se muestran en la Tabla 4.2, acompañados de los resultados del análisis de regresión, que permitieron estimar los valores de viscosidad. Los valores obtenidos a otras temperaturas se muestran en el material ANEXO.

Los resultados mostraron que todas las formulaciones tuvieron un comportamiento newtoniano, ya que los coeficientes de determinación de la regresión lineal presentaron valores elevados (R=0,9999). Este comportamiento reológico es propio de las microemulsiones (Nielloud y Marti-Mestres, 2010).

Tabla 4.2. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween® 80: propilenglicol (1:1 p/p) al incorporar agua.

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (0% p/p)					Agua (10% p/p)					Agua (20% p/p)				
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%
1,00	0,14	0,14	0,14	0,14	0,0013	0,18	0,17	0,17	0,17	0,0017	0,22	0,22	0,22	0,22	0,0017
1,17	0,16	0,16	0,17	0,16	0,0013	0,20	0,20	0,20	0,20	0,0024	0,26	0,25	0,25	0,25	0,0020
1,37	0,19	0,19	0,19	0,19	0,0011	0,24	0,24	0,24	0,24	0,0017	0,30	0,30	0,30	0,30	0,0028
1,60	0,22	0,23	0,22	0,22	0,0017	0,28	0,28	0,28	0,28	0,0011	0,35	0,35	0,35	0,35	0,0024
1,88	0,26	0,26	0,26	0,26	-	0,33	0,33	0,32	0,33	0,0024	0,41	0,41	0,40	0,41	0,0051
2,20	0,31	0,31	0,31	0,31	0,0011	0,39	0,38	0,38	0,38	0,0052	0,48	0,47	0,47	0,48	0,0046
2,58	0,36	0,36	0,36	0,36	0,0011	0,45	0,45	0,44	0,45	0,0040	0,56	0,56	0,55	0,56	0,0047
3,02	0,42	0,42	0,42	0,42	0,0013	0,53	0,52	0,52	0,52	0,0045	0,66	0,65	0,65	0,65	0,0066
3,53	0,49	0,49	0,49	0,49	0,0011	0,61	0,61	0,61	0,61	0,0040	0,77	0,76	0,76	0,76	0,0075
4,13	0,58	0,58	0,58	0,58	0,0013	0,72	0,71	0,71	0,71	0,0068	0,90	0,89	0,89	0,89	0,0090
4,84	0,68	0,68	0,68	0,68	0,0007	0,84	0,84	0,83	0,84	0,0058	1,06	1,04	1,04	1,05	0,0131
5,67	0,79	0,79	0,79	0,79	0,0011	0,99	0,98	0,97	0,98	0,0071	1,24	1,22	1,22	1,23	0,0131
6,63	0,93	0,93	0,93	0,93	0,0011	1,15	1,15	1,14	1,15	0,0065	1,45	1,43	1,42	1,43	0,0173
7,77	1,08	1,08	1,08	1,08	-	1,35	1,34	1,33	1,34	0,0113	1,69	1,67	1,67	1,68	0,0131
9,09	1,27	1,27	1,27	1,27	-	1,58	1,57	1,56	1,57	0,0113	1,98	1,96	1,95	1,96	0,0173
10,60	1,49	1,48	1,49	1,49	0,0065	1,85	1,84	1,82	1,84	0,0173	2,32	2,29	2,28	2,30	0,0236
12,50	1,74	1,74	1,74	1,74	-	2,17	2,16	2,14	2,16	0,0173	2,71	2,68	2,67	2,69	0,0236
14,60	2,04	2,03	2,04	2,04	0,0065	2,53	2,52	2,50	2,52	0,0173	3,18	3,14	3,13	3,15	0,0299
17,10	2,38	2,39	2,38	2,38	0,0065	2,97	2,95	2,93	2,95	0,0226	3,72	3,68	3,66	3,69	0,0346
20,00	2,79	2,79	2,79	2,79	0,0000	3,47	3,46	3,43	3,45	0,0236	4,35	4,31	4,29	4,32	0,0346
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0005	0,0000	0,0007	-	-	0,0021	0,0013	0,0011	-	-	0,0031	0,0015	0,0019	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,1395	0,1395	0,1395	0,1395	0,0000	0,1735	0,1727	0,1713	0,1725	0,0012	0,2174	0,2152	0,2142	0,2156	0,0019
Coeficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coeficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (40% p/p)					Agua (50% p/p)					Agua (60% p/p)				
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%
1,00	0,57	0,53	0,47	0,52	0,0582	0,29	0,28	0,28	0,28	0,0040	0,13	0,12	0,09	0,11	0,0261
1,17	0,61	0,58	0,54	0,58	0,0385	0,34	0,33	0,33	0,33	0,0068	0,14	0,11	0,09	0,11	0,0256
1,37	0,68	0,65	0,62	0,65	0,0358	0,40	0,38	0,39	0,39	0,0122	0,16	0,13	0,12	0,14	0,0267
1,60	0,78	0,74	0,71	0,74	0,0385	0,48	0,45	0,45	0,46	0,0187	0,19	0,16	0,14	0,16	0,0291
1,88	0,88	0,84	0,81	0,84	0,0442	0,56	0,53	0,53	0,54	0,0222	0,21	0,18	0,16	0,18	0,0280
2,20	1,01	0,96	0,92	0,96	0,0521	0,65	0,62	0,62	0,63	0,0206	0,23	0,20	0,19	0,21	0,0268
2,58	1,15	1,09	1,05	1,10	0,0570	0,76	0,72	0,73	0,73	0,0206	0,26	0,23	0,21	0,24	0,0293
3,02	1,31	1,25	1,20	1,25	0,0623	0,88	0,85	0,85	0,86	0,0203	0,30	0,26	0,24	0,27	0,0305
3,53	1,49	1,43	1,38	1,43	0,0623	1,02	0,99	0,99	1,00	0,0206	0,34	0,30	0,28	0,31	0,0326
4,13	1,71	1,64	1,58	1,64	0,0736	1,19	1,15	1,15	1,16	0,0261	0,38	0,34	0,32	0,35	0,0350
4,84	1,95	1,87	1,82	1,88	0,0742	1,39	1,35	1,35	1,36	0,0261	0,43	0,39	0,37	0,39	0,0346
5,67	2,23	2,15	2,09	2,16	0,0795	1,62	1,58	1,57	1,59	0,0299	0,49	0,45	0,42	0,45	0,0363
6,63	2,56	2,47	2,41	2,48	0,0854	1,88	1,84	1,84	1,85	0,0261	0,55	0,52	0,49	0,52	0,0339
7,77	2,93	2,84	2,77	2,85	0,0908	2,19	2,15	2,15	2,16	0,0261	0,60	0,59	0,56	0,58	0,0253
9,09	3,36	3,26	3,19	3,27	0,0967	2,56	2,51	2,52	2,53	0,0299	0,69	0,67	0,65	0,67	0,0225
10,60	3,85	3,76	3,68	3,76	0,0962	2,98	2,94	2,94	2,95	0,0261	0,78	0,77	0,75	0,77	0,0190
12,50	4,43	4,32	4,25	4,33	0,1027	3,48	3,44	3,43	3,45	0,0299	0,90	0,89	0,86	0,88	0,0217
14,60	5,09	4,98	4,91	4,99	0,1027	4,05	4,02	4,02	4,03	0,0196	1,02	1,02	0,99	1,01	0,0170
17,10	5,85	5,74	5,65	5,75	0,1133	4,73	4,70	4,71	4,71	0,0173	1,17	1,15	1,15	1,16	0,0131
20,00	6,74	6,62	6,54	6,63	0,1139	5,52	5,51	5,50	5,51	0,0113	1,34	1,31	1,33	1,33	0,0173
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,3103	0,2670	0,2280	-	-	0,0021	0,0013	0,0011	-	-	0,0979	0,0660	0,0399	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,3273	0,3227	0,3201	0,3234	0,0042	0,2748	0,2747	0,2744	0,2746	0,0002	0,0634	0,0644	0,0654	0,0644	0,0011
Coefficiente de correlación	0,9994	0,9996	0,9996	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9989	0,9992	0,9993	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Los resultados de viscosidad de las formulaciones pertenecientes a la línea de dilución con 10% p/p de *A. absinthium*, así como su composición, se representan en la Figura 4.6. Se observa que la viscosidad aumenta a medida que se diluye el sistema, hasta una concentración de 40% p/p de agua, y que posteriormente, la viscosidad disminuye de forma drástica. Estos cambios fueron más evidentes a 25 °C, en donde se registraron valores máximos de 0,32 Pa·s, mientras que la viscosidad se mantuvo estable a 60 °C, con valores cercanos a 0,03 Pa·s (Figura 4.6).

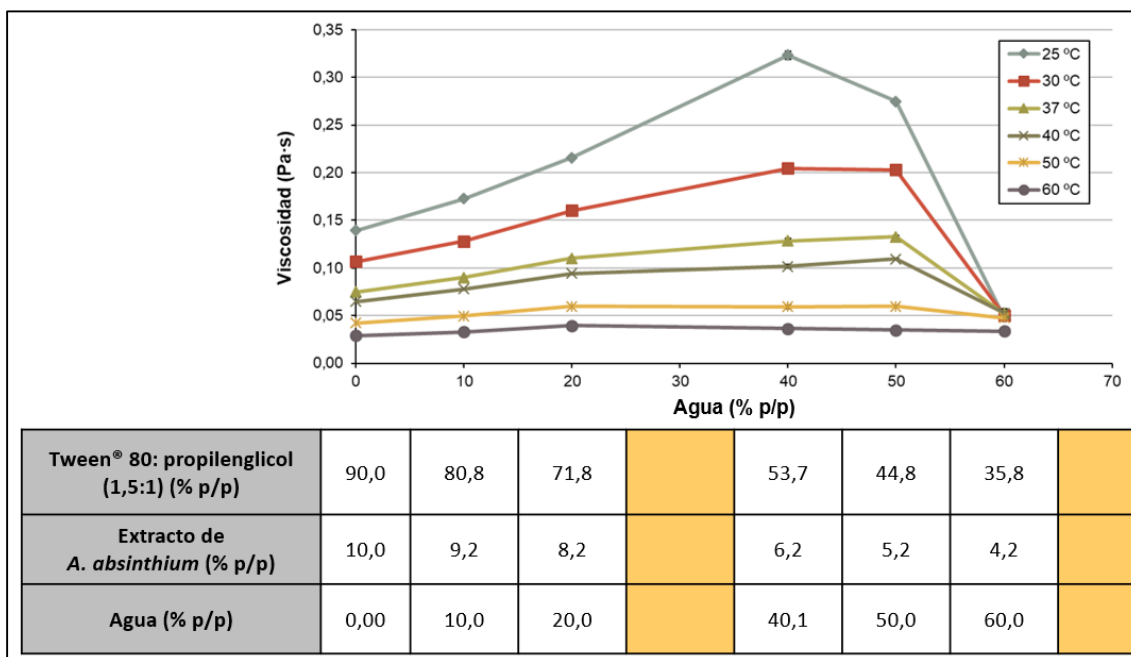


Figura 4.6. Relación de la viscosidad respecto del contenido en agua. Valores medios \pm IC95% (n=3).

4.1.2.2. Conductividad

4.1.2.2.1. Determinación de la constante de celda

La conductancia y la conductividad de las soluciones patrón de KCl (Tabla 4.3). muestran un aumento de la conductancia con la concentración de las soluciones patrón. Estos resultados se representan en la Figura 4.7, en donde se observa la correlación entre las medidas de conductancia y las de conductividad ($R^2=0,9997$). Los resultados del análisis de regresión se muestran en las Tabla 4.4, Tabla 4.5 y Tabla 4.6. La recta de regresión es $y=1,2243 \cdot x-12,107$ y la constante de celda equivale a $1,2243 \text{ cm}^{-1}$.

Tabla 4.3. Conductancia de las soluciones patrón de KCl.

Concentración de KCl (M)	Conductancia (μS)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
0,0001	14,5	13,44
0,0005	63,0	66,46
0,0010	130,0	132,20
0,0050	530,0	644,80
0,0100	1050,0	1271,00

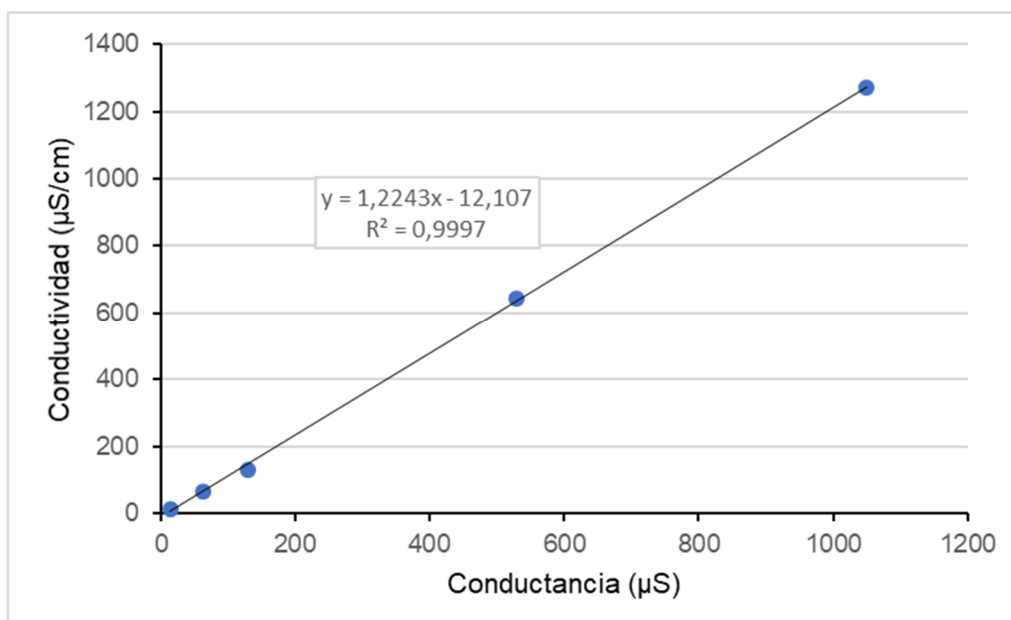


Figura 4.7. Recta de regresión de la conductividad respecto de la conductancia.

Tabla 4.4. Resultados de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,9998
R² ajustado	0,9996
Error típico	10,8574
Observaciones	5

Tabla 4.5. Resultados del análisis de la varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1147337,12	1147337,12	9732,87	$2,2959 \cdot 10^{-6}$
Residuos	3	353,65	117,88	-	-
Total	4	1147690,76	-	-	-

Tabla 4.6. Resultados del análisis de la varianza.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada	-12,1071	6,5772	-1,8408	0,1629	-33,0386	8,8245
Pendiente	1,2243	0,0124	98,6553	$2,2959 \cdot 10^{-6}$	1,1848	1,2638

4.1.2.2.2. Resultados de la línea de dilución

En la Tabla 4.7 se recogen los cambios en la conductividad con el aumento en la proporción de agua, hasta alcanzar un contenido de fase acuosa del 75% p/p. Los valores máximos de conductividad (85,18 $\mu\text{S}/\text{cm}$) se registraron a concentraciones medias de 63,14% p/p de fase acuosa. La incorporación de un mayor contenido en agua provoca la dilución del sistema, con la correspondiente disminución de la conductividad.

Tabla 4.7. Resultados del análisis de conductividad de una línea de dilución. A: agua (% p/p); B: conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$). n= 3. IC: intervalo de confianza al 95%.

Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Media		IC al 95%	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0,00	5,88	0,00	5,75	0,00	2,57	0,00	4,73	-	2,12
3,85	8,51	3,82	8,20	3,84	3,92	3,84	6,87	0,01	2,90
7,54	10,16	7,36	10,95	7,39	5,02	7,43	8,71	0,11	3,65
14,39	19,58	14,08	16,52	13,77	13,46	14,08	16,52	0,35	3,46
19,29	26,62	19,26	28,76	19,32	24,48	19,29	26,62	0,04	2,42
24,17	36,11	24,13	36,72	24,21	35,50	24,17	36,11	0,05	0,69
28,49	44,06	28,44	45,29	28,53	42,84	28,49	44,06	0,05	1,39
32,04	54,87	32,29	56,30	32,39	52,63	32,24	54,60	0,20	2,09
37,08	62,42	37,35	64,87	37,45	59,98	37,29	62,42	0,22	2,77
41,76	71,30	41,71	73,44	41,81	69,16	41,76	71,30	0,06	2,42
45,55	77,72	45,49	79,56	45,60	75,89	45,55	77,72	0,06	2,08
48,87	82,62	48,82	86,90	48,93	78,34	48,87	82,62	0,06	4,85
52,73	84,15	52,67	86,90	52,78	81,40	52,73	84,15	0,06	3,12
56,04	85,68	55,98	88,13	56,09	83,23	56,04	85,68	0,06	2,77
63,14	85,66	63,09	85,75	63,19	85,68	63,14	85,70	0,06	0,05
67,01	85,18	67,25	85,90	67,49	84,46	67,25	85,18	0,27	0,82
72,40	82,50	72,31	82,33	72,03	82,01	72,25	82,28	0,22	0,28
75,23	64,87	75,71	69,89	76,04	76,50	75,66	70,42	0,46	6,60

Los resultados de conductividad forman una curva sigmoidea, como se muestra en la Figura 4.8, que puede ser dividida en varias partes. En la primera, se observa la zona en la que el sistema es de fase externa oleosa, ya que el contenido en agua es de entre 0% y 15% p/p, con conductividades bajas, inferiores a 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La segunda es un área definida por el contenido en agua entre 15 y 50% p/p, que muestra un rápido incremento de la conductividad, hasta 85,18 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La tercera parte de la curva es una microemulsión O/A, en donde el contenido en agua supera los 63,14% p/p, y cuyos valores de conductividad son inferiores o equivalentes a los del área anterior. Estos resultados están en consonancia con los analizados por otros autores, relativos a microemulsiones formadas por emulgentes no iónicos (Djordjevic et al., 2004) (Figura 4.8).

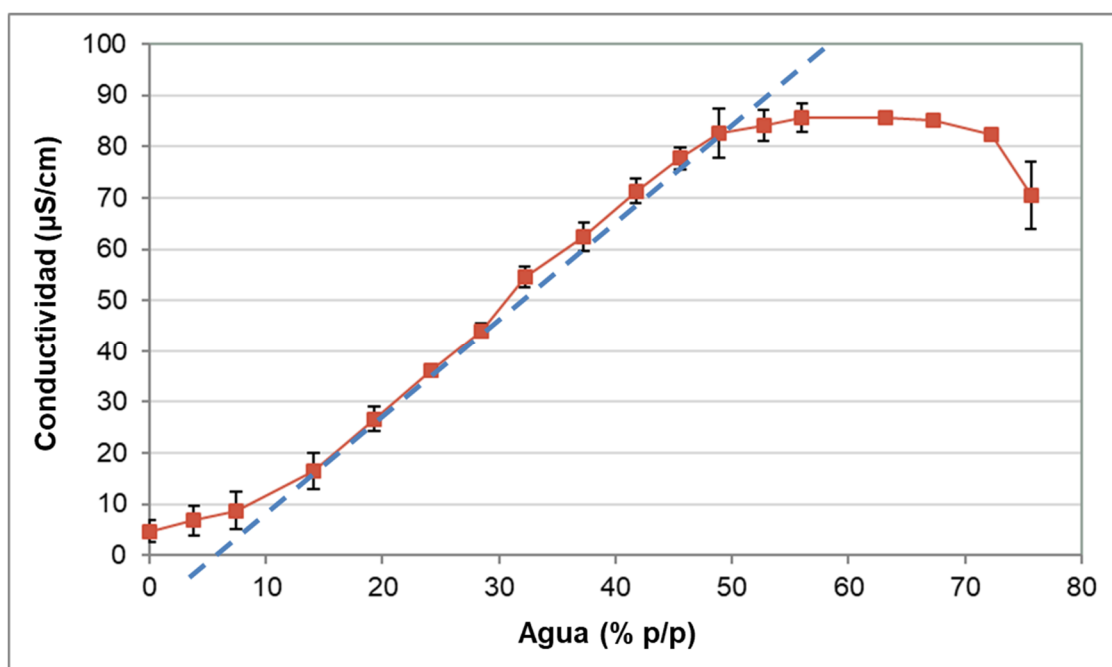


Figura 4.8. Cambio en la conductividad respecto al contenido en agua (% p/p). Valores medios \pm IC95% (n=3).

A partir de los resultados de conductividad, se estimó una recta de regresión que permitió determinar el umbral de percolación (Figura 4.8). Los resultados del análisis de regresión se muestran en la Tabla 4.8. La recta que mejor se ajusta a los resultados experimentales de conductividad presenta un buen ajuste ($R^2 = 0,9974$) y se corresponde con la ecuación:

$$y = 1,93x - 10,28 \quad (\text{Ec. 54})$$

Siendo y la conductividad ($\mu\text{S/cm}$) y x el contenido en agua (% p/p). El punto de corte de la recta con el eje de abscisas se alcanza cuando $y=0$ y $x=5,31\%$ p/p. Por tanto, el umbral de percolación se estima en $5,31\%$ p/p de agua, similar al alcanzado por otros investigadores en formulaciones constituidas por Tween[®] 80 (Nazar et al., 2009; Shao et al., 2018).

Tabla 4.8. Resultados del análisis de regresión lineal.

Coefficiente de correlación múltiple	0,9987
Coefficiente de determinación (R²)	0,9974
R² ajustado	0,9971
Error típico	1,2568
Observaciones	9

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4292,45792	4292,45792	2717,63325	2,504E-10
Residuos	7	11,0563872	1,57948388	-	-
Total	8	4303,5143	-	-	-

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada	-10,28	1,27	-8,07	8,6271E-05	-13,29	-7,27
Pendiente	1,93	0,04	52,13	2,504E-10	1,85	2,02

A continuación, se realizó el ajuste de los resultados de conductividad a un modelo polinomial (Tabla 4.9.). La recta con el mejor ajuste ($R^2=0,9976$ y R^2 ajustado= $0,9971$) se define con la ecuación:

$$y = 4,19761 + 0,279946 \cdot x + 0,0599246 \cdot x^2 - 0,00068534 \cdot x^3 \text{ (Ec. 55)}$$

Siendo y la conductividad ($\mu\text{S/cm}$) y x , la proporción de agua (% p/p).

Tabla 4.9. Resultados del análisis de regresión polinomial.

R²	0,9976
R² ajustado	0,9971
Error típico	1,65248
Error absoluto medio	1,16726
Observaciones	18

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor-P
Constante	4,1976	1,2397	3,3861	0,0044
Agua	0,2799	0,1503	1,8624	0,0837
Agua ²	0,0599	0,0047	12,6430	0,0000
Agua ³	-0,0007	0,0000	-16,7187	0,0000

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3	15936,0	5311,99	1945,29	0,0000
Residual	14	38,2296	2,73069	-	-
Total	17	15974,2	-	-	-

Posteriormente, se estimó la derivada de la ecuación anterior, obteniendo la siguiente expresión:

$$y = 0,279946 + 0,1198492 \cdot x - 0,002056 \cdot x^2 \quad (\text{Ec. 56})$$

Siendo y la derivada de la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) respecto del contenido en agua y x , la concentración de agua (% p/p). Los resultados muestran un máximo a 28,49% p/p de agua, lo que indica la presencia de un cambio en la estructura, desde una microemulsión A/O a una bicontinua o microemulsión de O/A (Figura 4.9).

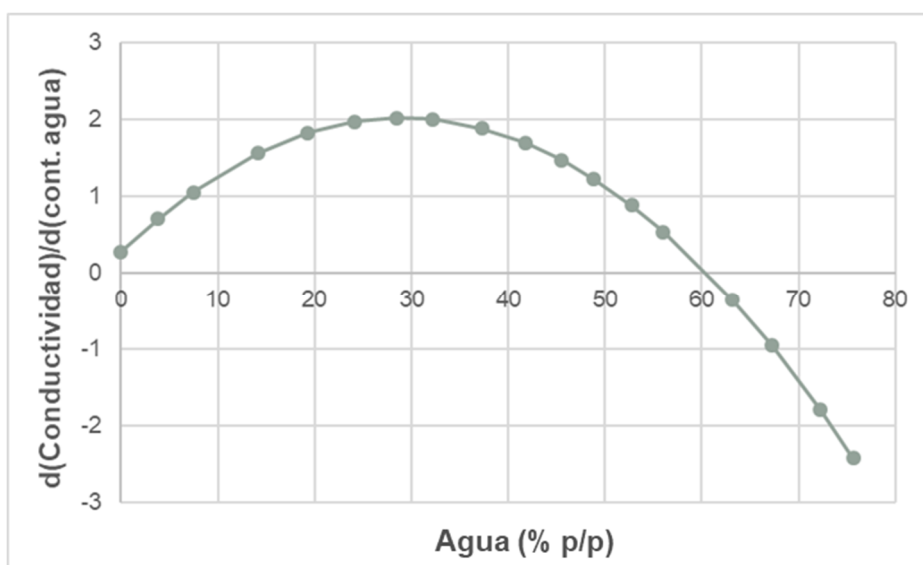


Figura 4.9. Derivada de la conductividad respecto del contenido en agua.

4.1.3. Desarrollo de una microemulsión del extracto de *A. absinthium*.

La composición de los experimentos desarrollados durante el proceso de optimización de la microemulsión se presenta en la Figura 4.10 y en la Tabla 4.10. Presentan un contenido en agua de 4,25 – 47,07% p/p, dando lugar a sistemas A/O o bicontinuos. Como se observa, algunos de los experimentos tienen la misma composición, con el objetivo de evaluar el ajuste del modelo y sus características (Myers et al., 2016).

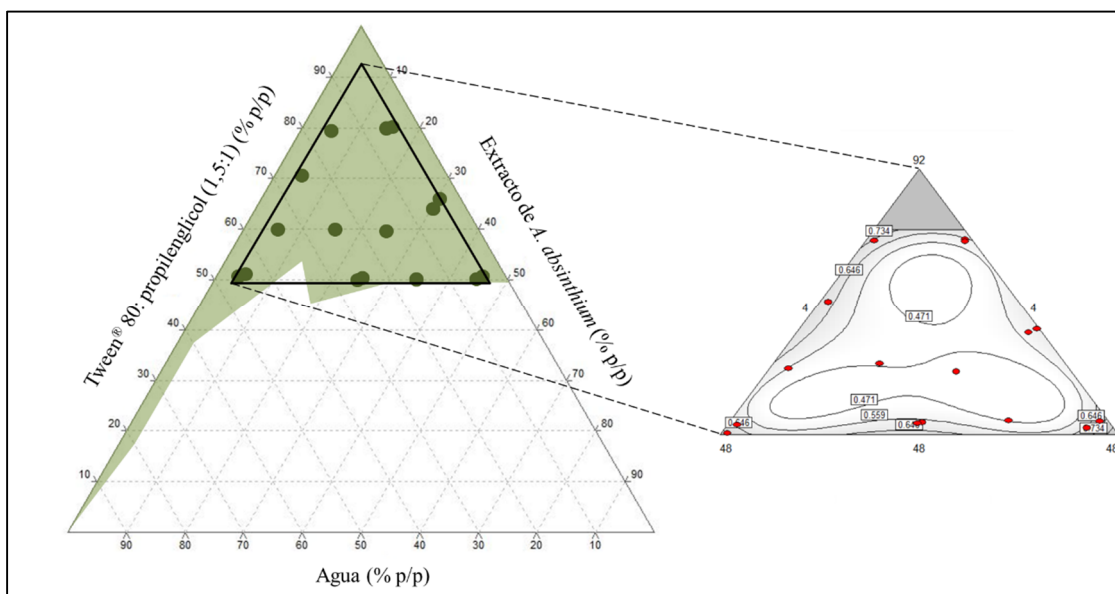


Figura 4.10. Distribución de los experimentos y la distribución del error estándar en el diagrama pseudoternario.

Tabla 4.10. Composición de los experimentos del diseño de mezclas.

Experimento	Tween® 80: propilenglicol (1,5:1) (% p/p)	Agua (% p/p)	Extracto de <i>A. absinthium</i> (% p/p)
1	48,21	47,05	4,74
2	64,88	5,49	29,63
3	65,50	4,25	30,26
4	58,41	16,71	24,88
5	80,14	14,88	4,99
6	80,35	4,78	14,87
7	79,99	4,95	15,06
8	49,89	25,23	24,88
9	50,03	24,67	25,30
10	58,93	34,96	6,12
11	69,99	25,03	4,98
12	59,71	24,53	15,76
13	49,11	6,93	43,96
14	49,61	45,29	5,10
15	50,17	5,02	44,81
16	50,29	15,00	34,71

4.1.3.1. Resultados de conductividad

Los resultados de conductividad de los experimentos variaron entre 10,68 y 69,82 mS/cm (Tabla 4.11). También se ha estimado la desviación estándar y el intervalo de confianza al 95% para cada experimento; sin embargo, el modelo de diseño de experimentos únicamente considera los valores medios, excluyendo las medidas de desviación.

Tabla 4.11. Resultados de las cinco medidas de conductividad de los 16 experimentos del diseño de mezclas.

Exp.	Conductividad (mS/cm)							
	1	2	3	4	5	Media	S (n-1)	IC 95%
1	67,8	74,1	68,5	68,8	68,5	69,54	2,30	2,02
2	18,0	14,0	13,6	17,9	9,5	14,57	3,14	2,75
3	20	8,01	8,16	11,1	8,2	11,09	4,60	4,03
4	18,1	33,3	18,2	18,7	18,0	21,26	6,02	5,28
5	15,5	20,6	15,5	18,2	15,3	17,02	2,09	1,83
6	8,7	30,3	8,5	9,9	8,6	13,21	8,56	7,50
7	16,6	8,76	10,6	8,7	8,8	10,68	3,04	2,67
8	31,9	31,3	29,9	28,8	31,5	30,68	1,16	1,01
9	32,8	37,1	32,3	30,9	41	34,82	3,72	3,26
10	50,3	46,3	47,6	46,3	51,4	48,38	2,10	1,84
11	29,1	29,3	29,5	29,2	29,6	29,34	0,19	0,16
12	25,7	37,3	25,9	33,8	25,9	29,72	4,89	4,28
13	4,07	4,4	27,9	4,2	27,9	13,70	11,60	10,16
14	70,0	71,0	67,6	67,4	73,1	69,82	2,14	1,88
16	15,4	15,6	15,6	15,8	15,8	15,65	0,15	0,13

Diferentes modelos, tales como lineal, cuadrático, cúbico especial y cúbico se ajustaron a los resultados de conductividad. El modelo cuadrático mostró el mejor ajuste, al presentar el valor más bajo de PRESS, y una relación adecuada entre el coeficiente de determinación predicho (0,9532) y ajustado (0,9831). El término de precisión adecuada fue 37,538; de forma que al ser superior a 4, indica que los resultados de la variable respuesta del modelo son adecuados, de forma que éste puede ser utilizado para inferir valores a partir de los resultados estadísticos (Dean et al., 2015; Huang et al., 2004; Said et al., 2017) (Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Resumen del análisis estadístico de los modelos ajustados a los resultados de conductividad.

Modelos	S (n-1)	R ²	R ² ajustado	R ² predicho	PRESS
Lineal	5,34	0,9371	0,9266	0,8947	573,76
Cuadrático	<u>2,57</u>	<u>0,9891</u>	<u>0,9831</u>	<u>0,9532</u>	<u>255,31</u>
Cúbico especial	2,71	0,9892	0,9811	0,9314	374,05
Cubico	2,59	0,9939	0,9828	0,6868	1707,03

Abreviaturas: PRESS: *Predicted Residual Error Sum of Squares*. R²: coeficiente de determinación.

Las características del modelo cuadrático se indican en la Tabla 4.13. Se observa que el valor F es 163,74 y el valor $p < 0,0001$, lo que indica que el modelo es significativo.

Tabla 4.13. Resultados del modelo cuadrático adaptado a las medidas de conductividad.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Modelo	5390,9089	5	1078,1818	163,7391	<0,0001
Mezcla lineal	5107,3910	2	2553,6955	387,8194	<0,0001
Mezcla de emulgentes*Agua	60,2046	1	60,2046	9,1430	0,0144
Mezcla de emulgentes*Extracto <i>A. absinthium</i>	3,8367	1	3,8367	0,5827	0,4648
Agua*Extracto <i>A. absinthium</i>	103,9565	1	103,9565	15,7874	0,0032
Residuales	59,2628	9	6,5848	-	-
Total	5450,1717	14	-	-	-

Los resultados del análisis de Box y Cox mostraron que el valor de λ es 1,21 (IC95%: -0,18; 1,94), cercano a 1, que indica que la variable de conductividad no necesita ser transformada para lograr un mejor ajuste de los resultados experimentales (Myers et al., 2016) (Figura 4.11).

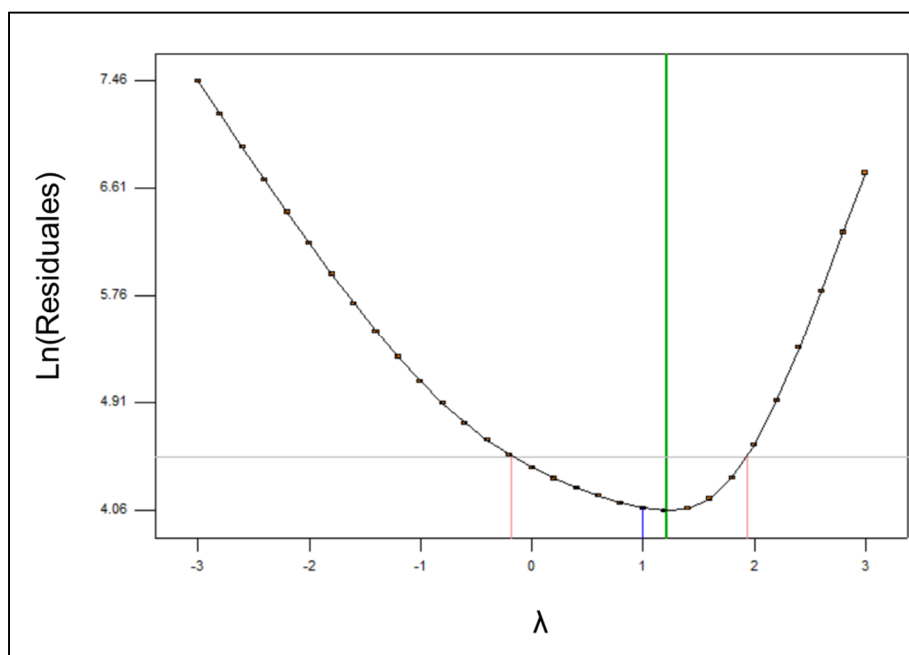


Figura 4.11. Gráfico del método Box y Cox del modelo de conductividad.

Además, la relación entre los valores actuales y predichos a la diagonal (Figura 4.12) muestra la significancia del modelo. Por otro lado, el gráfico de probabilidad normal de los residuales forma una línea recta, indicando que éstos siguen una distribución normal (Figura 4.13).

Asimismo, en el ANEXO se muestra la representación de los residuales estudentizados respecto de los valores predichos, del número de experimento, y de cada

componente de la microemulsión, que siguen una distribución aleatoria, mostrando que el modelo es adecuado (Myers et al., 2016).

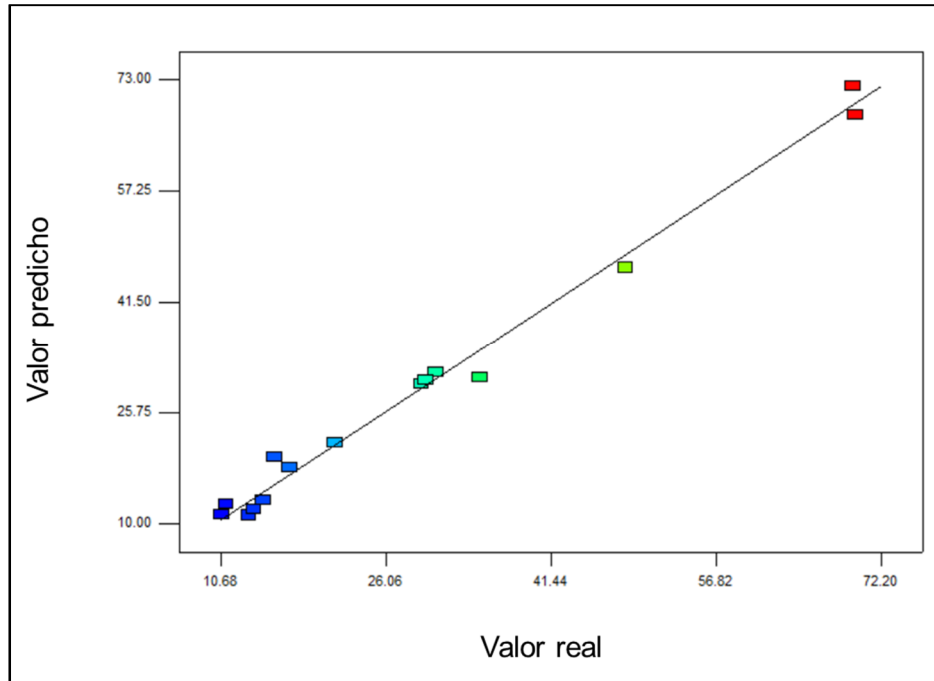


Figura 4.12. Comparación de los valores predichos y reales del modelo de conductividad.

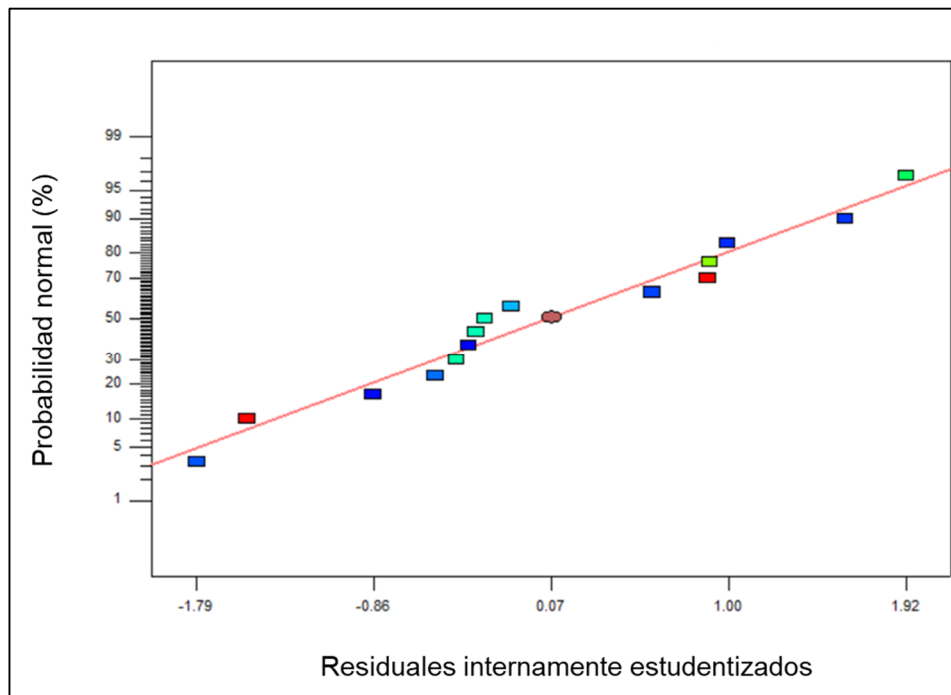


Figura 4.13. Gráfico de probabilidad normal del modelo de conductividad.

En base a estos resultados, se desarrolló la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Conductividad} = & 0.0419 \cdot \text{ME} + 2.5967 \cdot \text{A} + (-0.1557) \cdot \text{E} + (-0.0211) \cdot \text{ME} \cdot \\ & \text{A} + 0.0062 \cdot \text{ME} \cdot \text{E} + (-0.0212) \cdot \text{A} \cdot \text{E} \quad (\text{Ec. 57}), \end{aligned}$$

En donde la conductividad se mide en mS/cm, y ME indica el contenido en la mezcla de emulgentes (% p/p); A, el contenido en agua (% p/p) y E, el contenido en extracto de *A. absinthium* (% p/p).

La magnitud de los coeficientes muestra su contribución a la respuesta. Los signos positivos o negativos muestran su efecto en la respuesta. Por tanto, la ecuación muestra que el agua tiene una gran influencia en la conductividad (2,5967), como consecuencia de la naturaleza no iónica de los componentes. Tanto los emulgentes como el extracto de *A. absinthium* no favorecen el movimiento de los iones en el sistema y, por tanto, presentan una influencia escasa o incluso negativa en la conductividad (0,0419 y -0,1557). En la Figura 4.14 se observa que la conductividad aumenta con el incremento del contenido en agua del sistema.

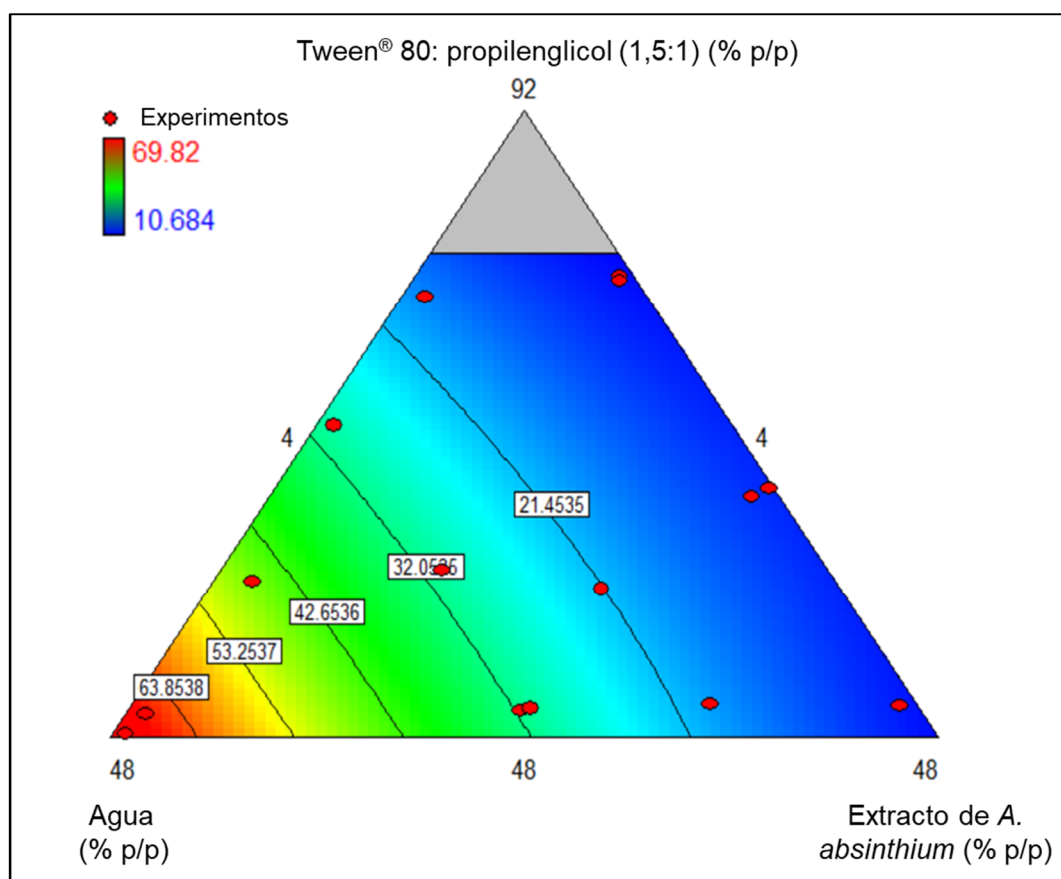


Figura 4.14. Resultados del modelo de conductividad (mS/cm).

4.1.3.2. Resultados de tamaño de gotícula.

Los resultados de tamaño de gotícula se muestran la Tabla 4.14. A partir de la distribución de tamaños medios de gotícula para cada muestra, se estimaron los diámetros correspondientes al primer, segundo (mediana) y tercer cuartil. Asimismo, se calcularon

los valores del sumatorio de $N \cdot D^2$ y $N \cdot D^3$, siendo N la frecuencia y D el diámetro. El cociente de estos dos últimos resultados se corresponde con el diámetro medio de Sauter. Se observa que los resultados varían entre 0,87 y 105,90 nm. La distribución media de los tamaños de gotícula de cada muestra se han representado gráficamente en el ANEXO.

Tabla 4.14. Resultados de tamaño de gotícula.

Exp.	Diámetro (D) (nm)			$\Sigma(N \cdot D^2)$ (nm ²)	$\Sigma(N \cdot D^3)$ (nm ³)	Diámetro medio de Sauter (nm)
	Q ₁	Mediana	Q ₃			
1	68,06	78,82	91,28	898448,37	95142667,45	105,90
2	0,54	0,62	0,72	57,92	50,35	0,87
3	0,54	0,62	0,83	72,92	75,53	1,04
4	1,12	1,29	1,74	297,51	578,10	1,94
5	2,33	2,70	3,12	948,87	3158,03	3,33
6	1,50	1,74	2,01	333,58	642,61	1,93
7	1,30	1,50	1,74	276,84	495,34	1,79
8	1,50	1,74	2,33	468,29	1132,99	2,42
9	1,74	2,01	2,33	530,92	1329,12	2,50
10	50,75	58,77	68,06	507680,27	39994833,95	78,78
11	11,70	13,55	15,69	24740,28	422317,75	17,07
12	3,12	3,62	4,19	1719,97	7711,08	4,48
13	0,54	0,62	0,72	59,66	52,48	0,88
14	68,06	78,82	91,28	844219,23	86238188,10	102,15
15	0,83	1,12	1,29	163,38	251,03	1,54
16	0,62	0,72	0,83	57,97	63,32	0,92

Abreviatura: N: número.

Al igual que en el apartado anterior, diferentes modelos se ajustaron a los resultados de tamaño de partícula. Aunque los resultados del modelo cúbico parecen presentar el mejor ajuste, un análisis de Box y Cox mostró que el valor de λ es -0,12 (IC 95%: -0,43 – 0,16), cercano a 0, lo que implica una transformación logarítmica y por tanto, la variable respuesta debe ser transformada a una base logarítmica, con el objetivo de obtener un mejor ajuste (Tabla 4.15 y Figura 4.15) (Myers et al., 2016).

Tras realizar esta transformación, los modelos cuadráticos y cúbicos presentaron el mejor ajuste; sin embargo, se seleccionó el modelo cuadrático, al presentar un ajuste similar, pero ser más simple que el modelo cúbico (Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Análisis estadístico de los resultados de tamaño de gotícula.

Modelos	Desviación estándar	R ²	R ² ajustado	R ² predicho	PRESS
Diámetro medio de Sauter (nm)					
Lineal	20,95	0,7347	0,6939	0,6042	8509,33
Cuadrático	9,25	0,9602	0,9403	0,9086	1965,91
Cúbico especial	9,68	0,9608	0,9346	0,8839	2495,51
Cúbico	3,09	0,9973	0,9933	0,9611	836,00
Log10(diámetro medio de Sauter (nm))					
Lineal	0,28	0,8757	0,8565	0,8117	1,56
Cuadrático	0,16	0,9693	0,9539	0,9113	0,74
Cúbico especial	0,17	0,9696	0,9493	0,9054	0,78
Cúbico	0,09	0,9938	0,9845	0,9777	1,84

Abreviatura: PRESS: *predicted residual error sum of squares*.

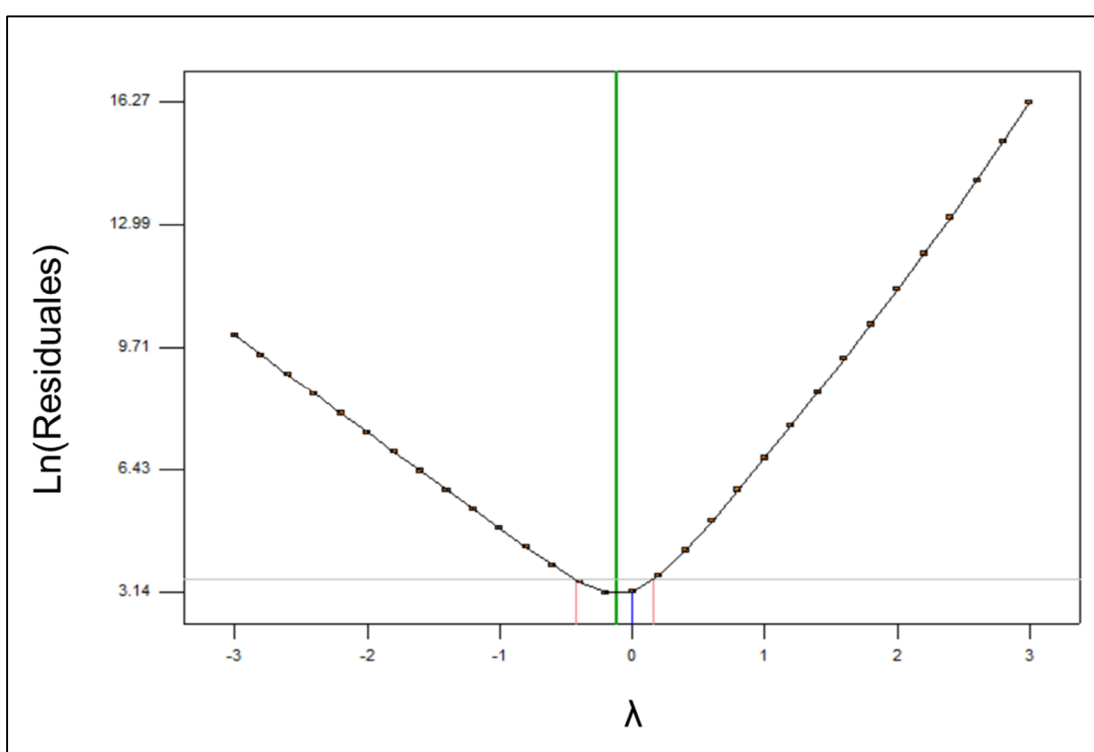


Figura 4.15. Gráfico del método Box y Cox del modelo de tamaño de gotícula.

Las características del modelo cuadrático desarrollado para las respuestas del diámetro medio de Sauter se muestran en la Tabla 4.16. El valor de F es de 63,13 mientras que el valor de $p < 0,0001$, lo que implica que el modelo es significativo. Además, la relación entre los valores reales y predichos mostraron la significancia del modelo (Figura 4.16). Asimismo, el gráfico de probabilidad normal de los residuales forma una línea recta, lo que indica que éstos siguen una distribución normal (Figura 4.17).

Además, en el ANEXO se muestra la representación de los residuales estudentizados respecto de los valores predichos, del número de experimento, y de cada

componente de la microemulsión, que siguen una distribución aleatoria, mostrando que, tras la transformación logarítmica, el modelo es adecuado (Myers et al., 2016).

Tabla 4.16. Resultados del modelo cuadrático basado en los resultados del tamaño de gotícula.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Modelo	8,03	5	1,61	63,13	< 0,0001
Mezcla lineal	7,26	2	3,63	142,58	< 0,0001
Mezcla de emulgentes*Agua	0,012	1	0,012	0,48	0,5047
Mezcla de emulgentes*Extracto de <i>A. absinthium</i>	$4,760 \cdot 10^{-4}$	1	$4,760 \cdot 10^{-4}$	0,019	0,8930
Agua* Extracto de <i>A. absinthium</i>	0,77	1	0,77	30,32	0,0003
Residuales	0,25	10	0,025	-	-
Total	8,29	15	-	-	-

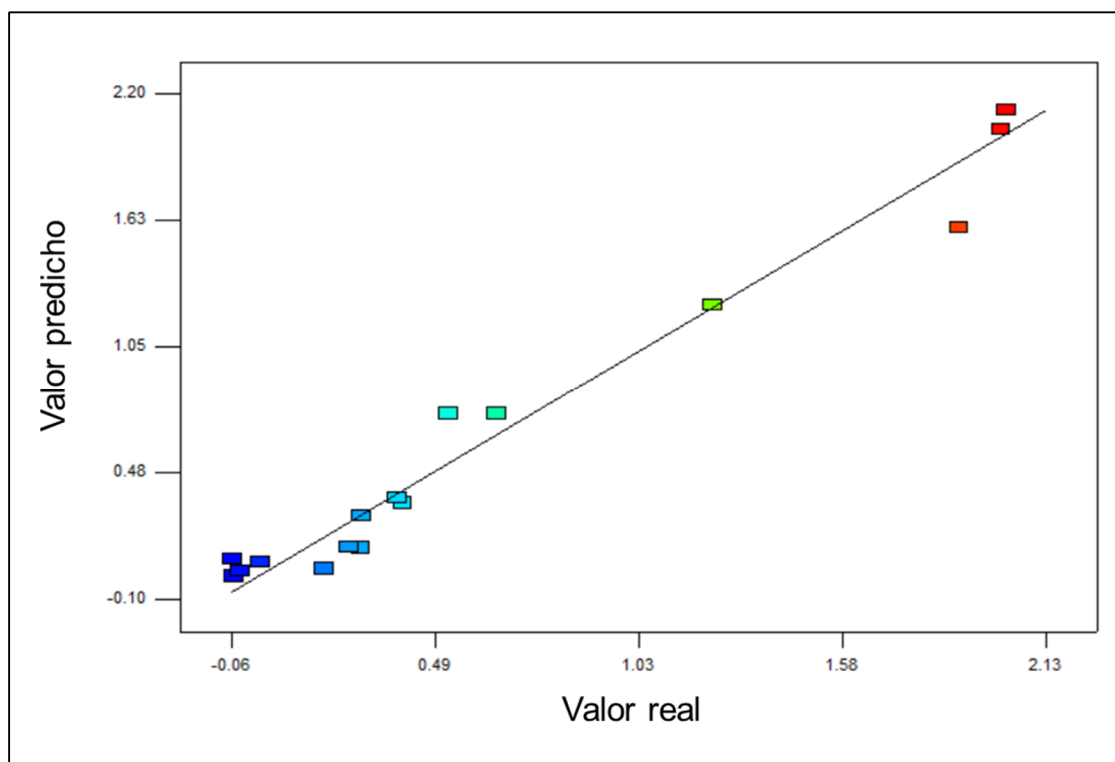


Figura 4.16. Comparación de los valores predichos y reales del modelo del tamaño de gotícula.

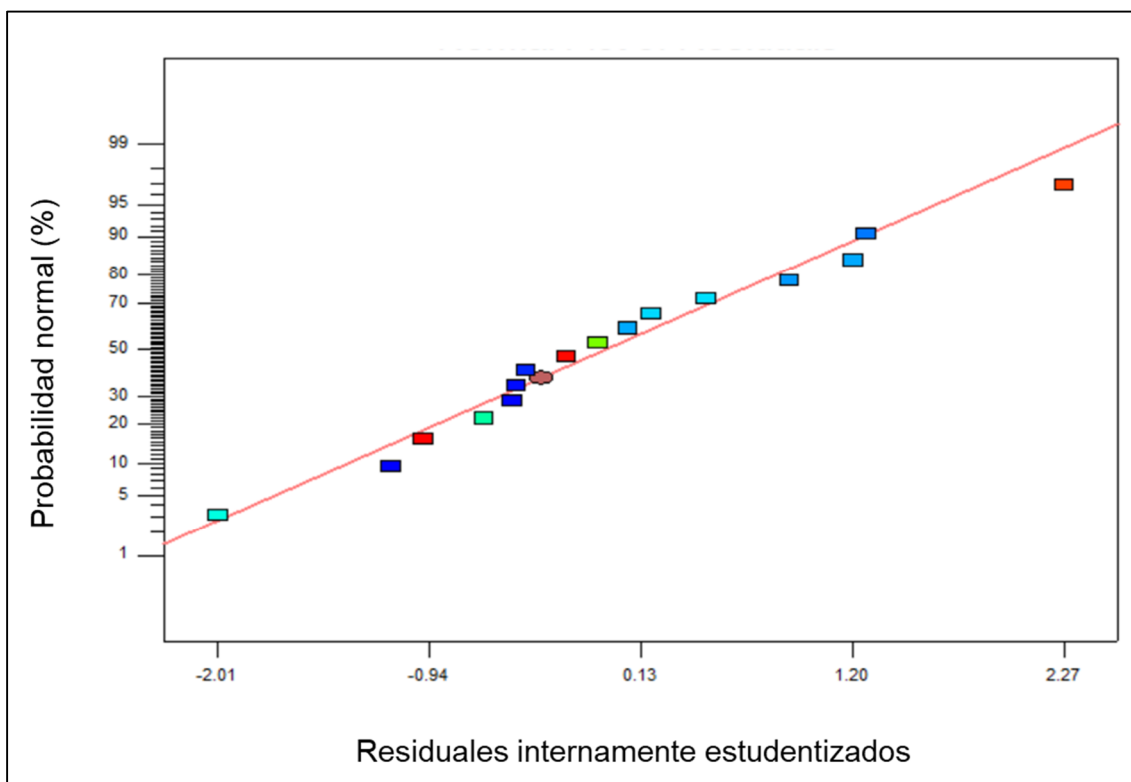


Figura 4.17. Gráfico de probabilidad normal del modelo del tamaño de gotícula.

En base a estos resultados, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{Log}(\text{Diámetro medio de Sauter (nm)}) = -0.0011 \cdot \text{ME} + 0.0396 \cdot \text{A} + 0.0077 \cdot \text{O} + 0.0003 \cdot \text{ME} \cdot \text{A} + (-0.0001) \cdot \text{ME} \cdot \text{E} + (-0.0017) \cdot \text{A} \cdot \text{E} \quad (\text{Ec. 58}),$$

En donde el diámetro medio de Sauter está expresado en nm, y ME indica el contenido en la mezcla de emulgentes; A, el contenido en agua y E, el contenido en extracto de *A. absinthium*.

La ecuación muestra que el extracto de *A. absinthium* y el agua son los componentes con la mayor influencia en el tamaño de gotícula. Los cambios en el tamaño de gotícula se presentan gráficamente en la Figura 4.18. Como se observa, la mayor parte de los experimentos presentan un diámetro medio de Sauter inferior a 10 nm. Sin embargo, a ciertas concentraciones de agua, el tamaño de gotícula aumenta drásticamente.

Estos resultados sugieren que la mayor parte de los experimentos presentan una estructura bicontinua, donde las moléculas del extracto de *A. absinthium* se disponen en lamelas. Por tanto, no es posible identificar glóbulos de fase oleosa y los que se detectan son muy pequeños (0,87 nm). Sin embargo, el incremento del contenido de fase acuosa

provoca la ruptura de las estructuras lamelares dando lugar a gotículas de tamaños mayores, cercanos a 100 nm. Cabe destacar que el aumento en el contenido acuoso del sistema también contribuye a mejorar la disponibilidad de moléculas de emulgente, favoreciendo la disolución de las dos fases inmiscibles.

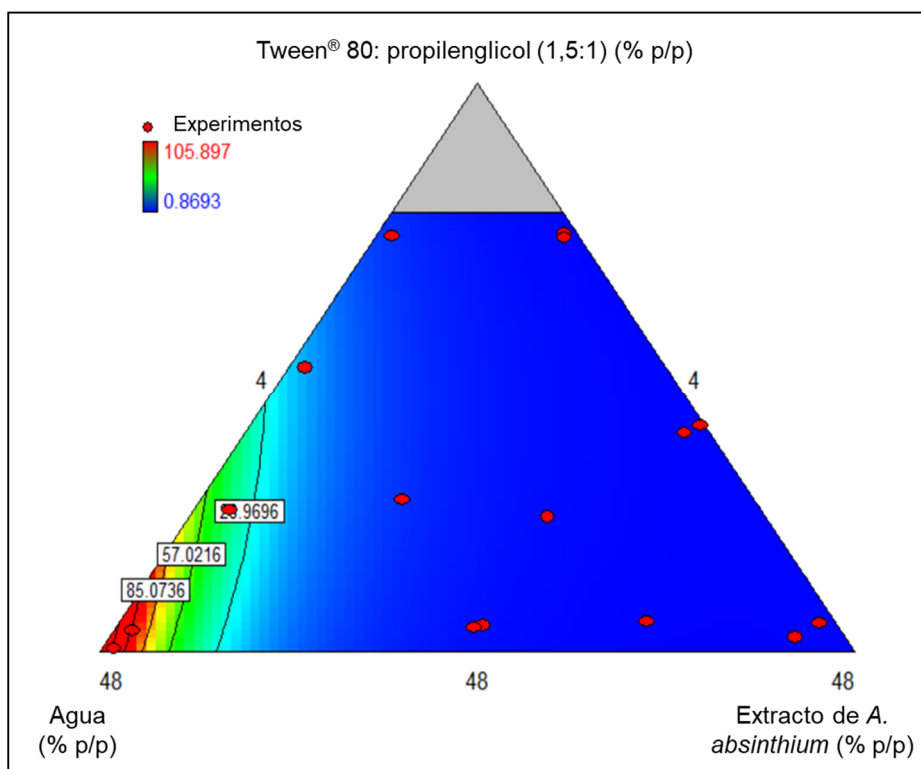


Figura 4.18. Representación de los resultados de diámetro medio de Sauter (nm).

4.1.3.3. Optimización de una microemulsión.

El objetivo de optimizar una formulación farmacéutica es obtener un sistema de alta calidad basado en unos niveles predeterminados de sus variables (Basalious et al., 2010). De acuerdo a nuestros resultados, las variables independientes fueron simultáneamente optimizadas para todas las respuestas utilizando la función de deseabilidad (Candiotti et al., 2014; Holm et al., 2006).

La cantidad de emulgentes y de extracto de *A. absinthium* se establecieron para ser maximizados y minimizar el contenido en agua. La solución optimizada con un valor de deseabilidad de 0,7670 fue 66,40% p/p. de la mezcla de emulgentes, 29,35% p/p de extracto de *A. absinthium* y 4,25% p/p de agua, con una concentración similar a la de los experimentos 2 y 3, ya incluidos en el diseño (Tabla 4.14).

La respuesta predicha por el modelo fue 1,1836 nm (IC 95%: 0,71 – 1,99), comparable al diámetro medio de Sauter medido en los experimentos 2 y 3 (0,87 nm y 1,04 nm, respectivamente) (Figura 4.19). Como se observa, la formulación optimizada es un sistema de A/O, con un tamaño de gotícula más bajo y una baja conductividad (alrededor de 10 mS/cm).

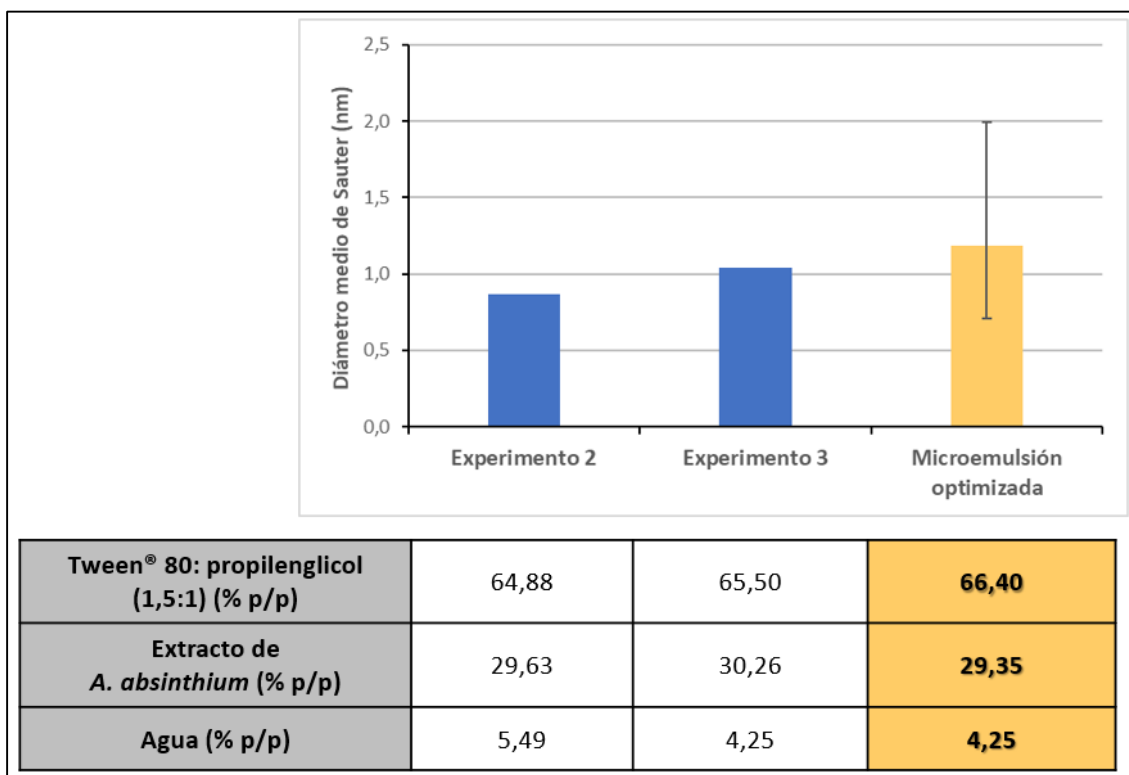


Figura 4.19. Composición y tamaño de gotícula de los experimentos 2 y 3 y de la microemulsión optimizada mediante un modelo teórico.

4.1.3.4. Caracterización de la microemulsión optimizada del extracto de *A. absinthium*.

4.1.3.4.1. Estudio de dispersión.

Debido al carácter oleoso de la microemulsión optimizada, se analizó su comportamiento en un medio acuoso. Se midió el tamaño de gotícula a los 15 y a los 30 minutos de su dispersión. Los resultados mostraron que la distribución de los tamaños de gotícula fue similar en las muestras tomadas a los 15 y a los 30 minutos. El tamaño más frecuente fue 11,69 nm. Los diámetros medios de Sauter \pm DE fueron $49,78 \text{ nm} \pm 5,34 \text{ nm}$ y $49,80 \text{ nm} \pm 27,26 \text{ nm}$ a los 15 y a los 30 minutos, respectivamente (Figura 4.20).

Tabla 4.17. Resultados del diámetro medio de Sauter tras la dispersión a los 15 y a los 30 minutos de la microemulsión optimizada.

	Diámetro (D) (nm)			$\Sigma(N \cdot D^2)$ (nm ²)	$\Sigma(N \cdot D^3)$ (nm ³)	Diámetro medio de Sauter (nm)	Media	S (n-1)
	Q ₁	Mediana	Q ₃					
Tiempo de disgregación: 15 minutos								
Muestra 1	10,10	11,70	13,55	2389352,69	137016264,80	57,34	52,34	4,33
Muestra 2	10,10	11,70	13,55	1768194,21	88030797,52	49,79		
Muestra 3	10,10	11,70	13,55	1723667,03	87964384,91	49,89		
Tiempo de disgregación: 30 minutos								
Muestra 1	8,72	10,10	11,70	11811,92	132825,73	11,25	36,89	22,21
Muestra 2	10,10	11,70	13,55	1767280,44	88014928,55	49,80		
Muestra 3	8,72	10,10	11,70	1776404,74	88140112,38	49,62		

Abreviatura: N: número.

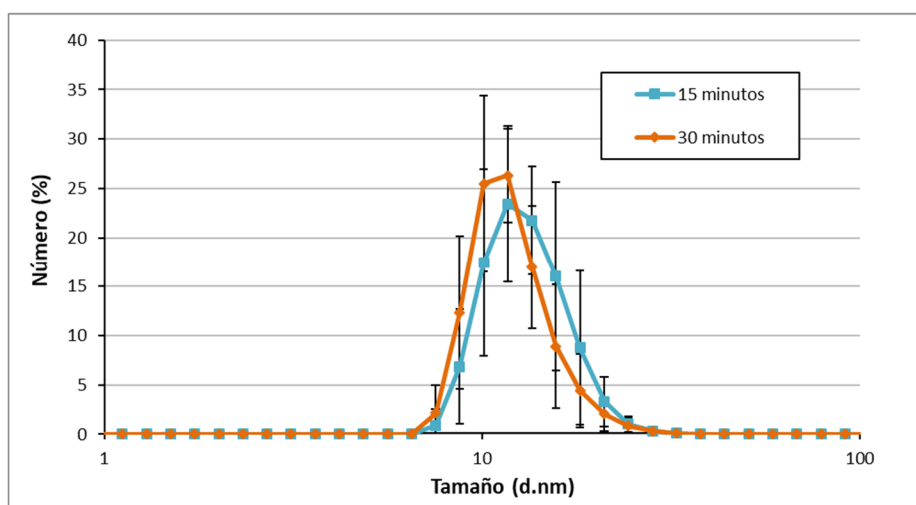


Figura 4.20. Distribución del tamaño de gotícula a los 15 y a los 30 minutos (Valores medios \pm DE) (n=3).

Las muestras presentaron un aspecto transparente y los resultados de transmitancia fueron $98,03\% \pm 0,34\%$ a los 15 minutos y $98,30\% \pm 0,04\%$ a los 30 minutos (Tabla 4.18).

Tabla 4.18. Resultados de transmitancia según el tiempo de dispersión de la microemulsión optimizada.

Transmitancia (%)	Tiempo de disgregación	
	15 minutos	30 minutos
Muestra 1	97,90	98,34
Muestra 2	97,78	98,30
Muestra 3	98,41	98,25
Media	98,03	98,30
S (n-1)	0,34	0,04

Estos resultados muestran la microemulsión optimizada se dispersa en el medio gástrico, formando una emulsión de fase externa oleosa, en menos de 15 minutos, dando

lugar a gotículas de 10 nm, que mejorarán la biodisponibilidad del extracto de *A. absinthium*.

4.1.3.4.1. Estudio reológico.

Las características reológicas de la microemulsión optimizada también se han analizado a 25°, 30° y 37° C y se han comparado con los resultados del extracto de *A. absinthium* puro a 25° C. Los resultados se presentan en las Tabla 4.19 y Tabla 4.20, acompañados de los resultados del análisis de regresión, que permitieron estimar los valores de viscosidad. Se observa que la viscosidad del extracto de *A. absinthium* a 25° C es 0,0035 Pa·s, claramente inferior a la correspondiente a la microemulsión optimizada a la misma temperatura (0,0739 Pa·s). Estos resultados se deben a la combinación del extracto vegetal con excipientes con mayor viscosidad, como los emulgentes (Figura 4.21).

Tabla 4.19. Resultados del análisis reológico del extracto de *A. absinthium* a 25° C.

Velocidad de cizalla [1/s]	Extracto de <i>A. absinthium</i> (25° C)				
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%
1,00	0,0060	0,0057	0,0028	0,0048	0,0020
1,17	0,0069	0,0049	0,0033	0,0050	0,0021
1,37	0,0075	0,0062	0,0064	0,0067	0,0008
1,60	0,0072	0,0075	0,0072	0,0073	0,0002
1,88	0,0083	0,0078	0,0102	0,0088	0,0014
2,20	0,0106	0,0073	0,0098	0,0092	0,0019
2,58	0,0116	0,0094	0,0112	0,0107	0,0013
3,02	0,0144	0,0099	0,0132	0,0125	0,0026
3,53	0,0146	0,0140	0,0149	0,0145	0,0005
4,13	0,0162	0,0140	0,0155	0,0152	0,0013
4,84	0,0190	0,0181	0,0175	0,0182	0,0009
5,67	0,0195	0,0212	0,0215	0,0207	0,0012
6,63	0,0239	0,0238	0,0239	0,0239	0,0001
7,77	0,0282	0,0291	0,0281	0,0285	0,0006
9,09	0,0367	0,0337	0,0335	0,0346	0,0020
10,60	0,0425	0,0372	0,0406	0,0401	0,0030
12,50	0,0457	0,0452	0,0438	0,0449	0,0011
14,60	0,0532	0,0511	0,0527	0,0523	0,0012
17,10	0,0643	0,0623	0,0613	0,0626	0,0017
20,00	0,0711	0,0729	0,0706	0,0715	0,0014
Características de la regresión					
Ordenada en el origen	0,0022	0,0007	0,0015	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0035	0,0036	0,0035	0,0035	4,29·10⁻⁵
Coefficiente de correlación	0,9975	0,9989	0,9989	-	-

Coeficiente de determinación	0,9951	0,9978	0,9978	-	-
------------------------------	--------	--------	--------	---	---

Tabla 4.20. Resultados del estudio de reología de la microemulsión a 25°, 30° y 37° C.

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Microemulsión (25° C)					Microemulsión (30° C)					Microemulsión (37° C)				
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	IC al 95%
1,00	0,0791	0,0748	0,0750	0,0763	0,0027	0,0656	0,0603	0,0542	0,0600	0,0065	0,0439	-0,0215	0,0468	0,0231	0,0437
1,17	0,0994	0,0942	0,1000	0,0979	0,0036	0,0910	0,0716	0,0771	0,0799	0,0113	0,0617	0,0310	0,0468	0,0465	0,0174
1,37	0,0682	0,0508	0,0160	0,0450	0,0301	0,0540	0,0867	0,0239	0,0549	0,0355	0,0299	0,0556	0,0545	0,0467	0,0164
1,60	0,1010	0,1090	0,1230	0,1110	0,0126	0,0869	0,0751	0,0833	0,0818	0,0068	0,0556	0,0919	0,0687	0,0721	0,0208
1,88	0,1260	0,1320	0,1530	0,1370	0,0160	0,1030	0,0921	0,1010	0,0987	0,0066	0,0713	0,0786	0,0891	0,0797	0,0101
2,20	0,1520	0,1550	0,1630	0,1567	0,0064	0,1220	0,1240	0,1200	0,1220	0,0023	0,0943	0,0922	0,0598	0,0821	0,0219
2,58	0,1900	0,1890	0,1930	0,1907	0,0024	0,1600	0,1530	0,1460	0,1530	0,0079	0,1130	0,0685	0,1100	0,0972	0,0281
3,02	0,1750	0,1840	0,1770	0,1787	0,0053	0,1370	0,1390	0,1300	0,1353	0,0053	0,0890	0,1220	0,1270	0,1127	0,0234
3,53	0,2610	0,2650	0,2660	0,2640	0,0030	0,2130	0,2070	0,2090	0,2097	0,0035	0,1580	0,1520	0,1510	0,1537	0,0043
4,13	0,3000	0,3090	0,3080	0,3057	0,0056	0,2490	0,2450	0,2410	0,2450	0,0045	0,1760	0,1540	0,1770	0,1690	0,0147
4,84	0,3520	0,3570	0,3500	0,3530	0,0041	0,2870	0,2690	0,2790	0,2783	0,0102	0,2080	0,2160	0,2080	0,2107	0,0052
5,67	0,4090	0,4200	0,4180	0,4157	0,0066	0,3340	0,3270	0,3290	0,3300	0,0041	0,2420	0,2300	0,2480	0,2400	0,0104
6,63	0,4920	0,4940	0,4840	0,4900	0,0060	0,4000	0,3910	0,3890	0,3933	0,0066	0,2980	0,2790	0,2780	0,2850	0,0128
7,77	0,5720	0,5750	0,5660	0,5710	0,0052	0,4640	0,4450	0,4510	0,4533	0,0110	0,3400	0,3460	0,3190	0,3350	0,0160
9,09	0,6560	0,6620	0,6640	0,6607	0,0047	0,5310	0,5230	0,5200	0,5247	0,0064	0,3850	0,3940	0,3780	0,3857	0,0091
10,60	0,7720	0,7790	0,7750	0,7753	0,0040	0,6210	0,6060	0,6130	0,6133	0,0085	0,4540	0,4700	0,4480	0,4573	0,0129
12,50	0,9310	0,9310	0,9260	0,9293	0,0033	0,7520	0,7350	0,7360	0,7410	0,0108	0,5570	0,5460	0,5100	0,5377	0,0278
14,60	1,0600	1,0700	1,0600	1,0633	0,0065	0,8520	0,8480	0,8390	0,8463	0,0075	0,6270	0,6020	0,6260	0,6183	0,0160
17,10	1,2600	1,2600	1,2600	1,2600	-	1,0100	0,9920	0,9950	0,9990	0,0109	0,7470	0,7510	0,7200	0,7393	0,0191
20,00	1,4700	1,4600	1,4500	1,4600	0,0113	1,1700	1,1500	1,1500	1,1567	0,0131	0,8660	0,8650	0,8550	0,8620	0,0069
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	-0,0101	-0,0076	-0,0066	-	-	-0,0026	-0,0049	-0,0108	-	-	-0,0080	-0,0145	-0,0026	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0741	0,0741	0,0736	0,0739	0,0003	0,0591	0,0582	0,0587	0,0586	0,0005	0,0440	0,0443	0,0424	0,0436	0,0011
Coefficiente de correlación	0,9995	0,9994	0,9985	-	-	0,9991	0,9995	0,9988	-	-	0,9987	0,9969	0,9991	-	-
Coefficiente de determinación	0,9989	0,9988	0,9971	-	-	0,993	0,9989	0,9978	-	-	0,9974	0,9939	0,9983	-	-

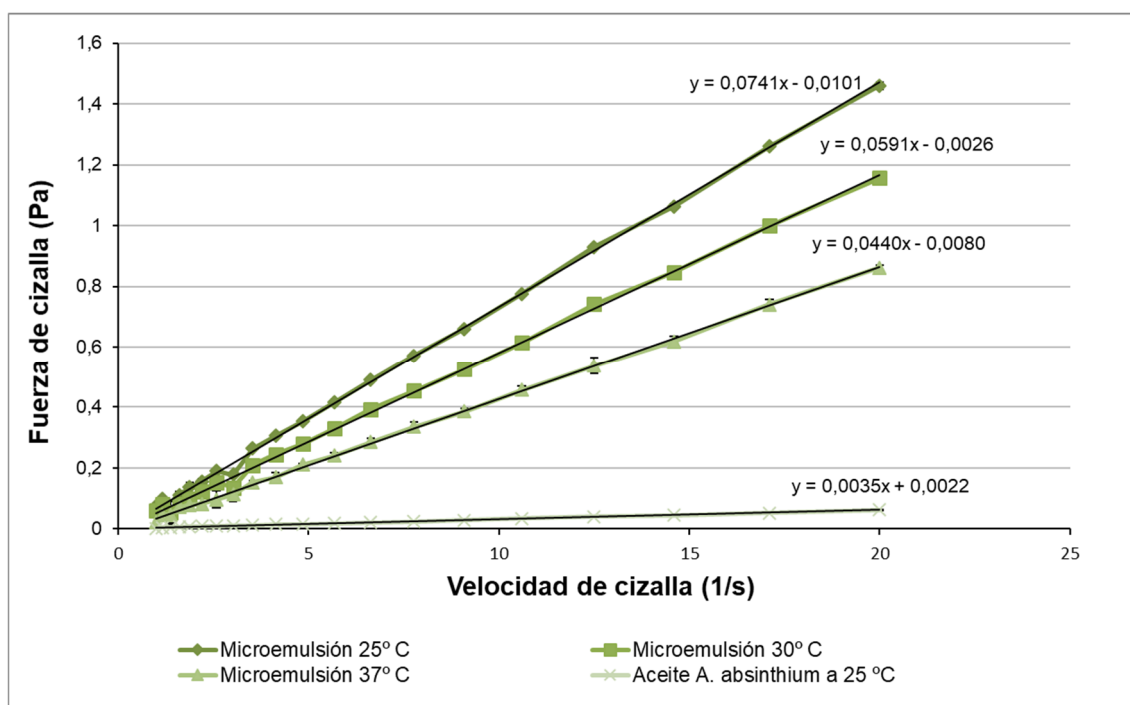


Figura 4.21. Resultados del estudio reológico del extracto de *A. absinthium* (25° C y la microemulsión a 25°, 30° y 37° C).

Cabe destacar que la viscosidad de la microemulsión optimizada a 25° C (0,0741 Pa·s) es inferior a los valores registrados en la línea de dilución analizada a la misma temperatura (0,048 – 0,3234 Pa·s) (Figura 4.6). Estos resultados se deben a que la microemulsión optimizada presenta un menor contenido en emulgentes y una mayor concentración del extracto de *A. absinthium*.

4.1.4. Actividad antinematoda de una microemulsión del extracto de *A. absinthium*.

Se analizó la actividad nematocida de la microemulsión optimizada y de una disolución del extracto de *A. absinthium*. Debido a que la concentración máxima del extracto en la disolución es 0,05% v/v, se diluyó la microemulsión previamente desarrollada para igualar la concentración del extracto.

En la Figura 4.22A podemos ver el aspecto de las larvas de *T. spiralis* L1, antes de entrar en contacto con formulación del extracto de *A. absinthium*. Como puede observarse, se encuentran enrolladas sobre sí mismas, en su conformación habitual.



Figura 4.22. Imagen microscópica de las larvas L1 de *T. spiralis* (A), administración por sonda buco-gástrica de las formulaciones (B) y ratones Swiss CD1 (C).

En la Tabla 4.21 se muestran los resultados de los experimentos *ex vivo*, indicando el número medio de parásitos adultos de *T. spiralis* por grupo y los porcentajes de reducción respecto del grupo control. Los resultados no mostraron diferencias entre el grupo control y los grupos placebo, tanto del grupo que recibió la mezcla de disolventes (DMSO:Tween® 80) ($p=0,4999$) como los que recibieron la mezcla de emulgentes ($p=0,2431$) (Figura 4.23). Por tanto, los excipientes de ambas formulaciones no afectan a la viabilidad de las larvas L1 de *T. spiralis* en las condiciones del estudio.

Las formulaciones constituidas por el extracto de *A. absinthium* mostraron actividad nematocida. La disolución de DMSO:Tween® 80 mostró una reducción del 86,51% respecto del grupo control, mientras que la emulsión redujo el 95,72% de los parásitos. Ambas formulaciones disminuyeron la presencia de parásitos intestinales respecto de sus respectivos grupos placebo ($p=0,0002$ y $p=0,0001$) (Tabla 4.21 y Figura 4.23). Los resultados de la disolución están en consonancia con los obtenidos en estudios previos realizados por García-Rodríguez *et al.*, con reducciones en el número de parásitos intestinales superiores al 80,00% a concentraciones de 0,5 mg/mL (0,05% v/v) del extracto de *A. absinthium* (García-Rodríguez *et al.*, 2015).

Tabla 4.21. Número medio de parásitos y porcentajes de reducción por grupo.

Grupo	Número medio de parásitos adultos [IC 95%]	Reducción (%)	Valor de p respecto de control	Valor de p respecto de placebo	Valor de p respecto de la disolución
Control (n=5)	60,80 [35,44 – 86,16]				
Placebo de la disolución (n=6)	72,00 [52,78 – 91,22]	-18,42	0,4999		
Disolución (0,05% v/v de EAA) (n=5)	8,20 [6,20 – 10,20]	86,51		0,0002	
Placebo de la emulsión (n=6)	81,67 [60,50 – 102,83]	-34,32	0,2431		
Emulsión (0,05% v/v EAA) (n=5)	2,60 [0,78 – 4,42]	95,72		0,0001	0,0033

Abreviaturas: EAA: extracto de *A. absinthium*; IC: intervalo de confianza.

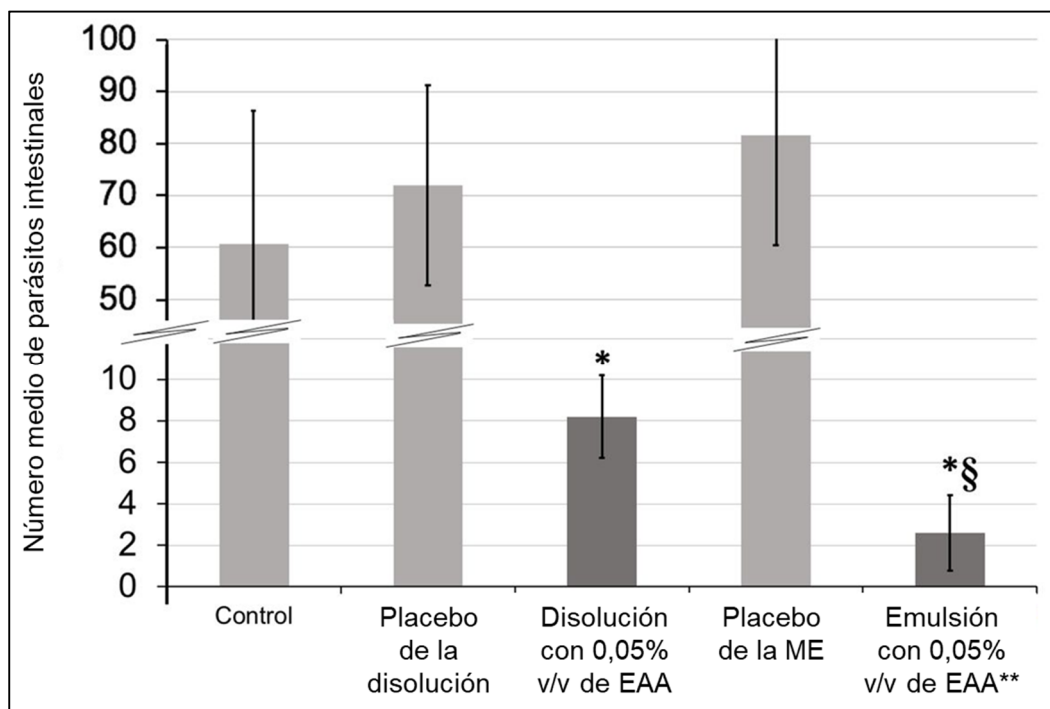


Figura 4.23. Número medio de parásitos adultos por grupo (Valores medios \pm IC 95%) ($n = 6$). Nota: * $p < 0.05$ respecto del grupo control; § $p < 0.05$, respecto del grupo que recibió la disolución. **Disolución de la microemulsión optimizada hasta alcanzar una concentración de 0,05% w/w de extracto de *A. absinthium* (AAE).

A pesar de presentar la misma concentración del extracto de *A. absinthium*, el grupo tratado con la emulsión mostró una mayor reducción en el número de parásitos respecto del que recibió la disolución ($p=0,0033$) (Tabla 4.21 y Figura 4.23). Estos resultados muestran que la emulsión mejora la biodisponibilidad del extracto de *A. absinthium* en las condiciones del estudio, incrementando su actividad (Alvarez et al., 2007; García et al., 2003).

La microemulsión desarrollada presenta varias ventajas. En primer lugar, puede diluirse sin observar la separación de las capas acuosa y oleosa, de forma que facilita la dosificación y la administración oral del extracto de *A. absinthium*. En segundo lugar, la microemulsión contiene emulgentes menos tóxicos que el DMSO (LD_{50} : 7,9 g/kg en ratones por vía oral). En tercer lugar, la nueva formulación es capaz de incorporar una mayor concentración del extracto que una disolución, mejorando su biodisponibilidad. Finalmente, las microemulsiones pueden constituir formulaciones intermedias de otras formulaciones como comprimidos, permitiendo la administración oral del extracto de *A. absinthium*.

4.2. DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN EN COMPRIMIDOS.

4.2.1. Inclusión de la microemulsión en un material de sílice.

La microemulsión previamente optimizada fue incorporada al material de sílice Syloid® XDP 3150 en una proporción 1:1,5 p/p; dando lugar a un polvo fluido, sin aglomerados (Figura 4.24). Esta proporción para la inclusión en el material de sílice está en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores, que incorporaron formulaciones líquidas en Syloid® XDP 3150 en proporciones cercanas a 1:1,61 p/p, obteniendo una mezcla pulverulenta con buenas propiedades de flujo (Madhav y Kishan, 2017).

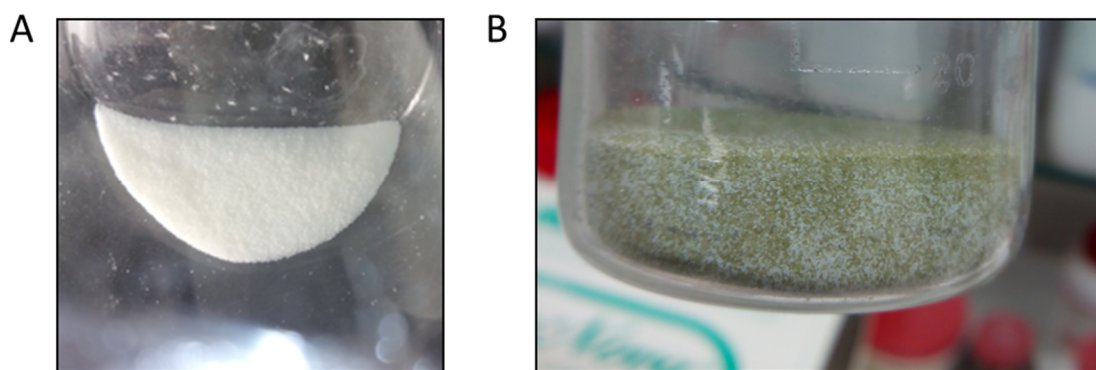


Figura 4.24. Material de Syloid® XDP 3150 cargado con la microemulsión optimizada.

También se analizó la apariencia del sistema a 40x y a 100x, utilizando un microscopio óptico (Figura 4.25). Las imágenes muestran la estructura irregular de los granos de sílice y el tono amarillento de la formulación en su interior. El tamaño de los granos, inferior a 200 μm , se corresponde con el indicado en las especificaciones del producto comercial (150 μm) (Grace, 2015b).

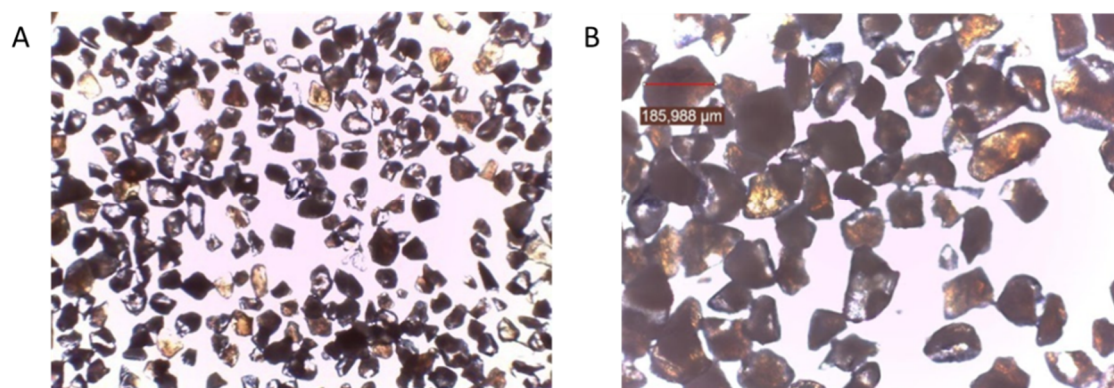


Figura 4.25. Apariencia del material de sílice Syloid® XDP cargado con la microemulsión (1:1,5) a 40x (A) y 100x (B).

4.2.2. Cinéticas de liberación de formulaciones líquidas a partir del material de sílice cargado.

4.2.2.1. Método espectrofotométrico.

Las muestras procedentes del estudio de dispersión a los 2 minutos fueron analizadas utilizando un método espectrofotométrico. Debido a la complejidad de la composición del extracto de *A. absinthium*, se decidió comparar los espectros entre 200 y 600 nm. Los resultados obtenidos al comparar la dispersión de la microemulsión y tras su incorporación al material de sílice, se muestran en la Figura 4.26. Se observan absorbancias máximas entre 200 y 300 nm, con un descenso significativo a partir de 350 nm, en todas las muestras analizadas. Además, la muestra procedente de la dispersión de la microemulsión muestra mayores absorbancias que las muestras procedentes de la microemulsión previamente cargada en el material de sílice a partir de 270 nm. Estos resultados parecen sugerir que no todos los componentes de la microemulsión cargados en el material de sílice se liberaron en el medio de dispersión. De este modo, es posible que ciertos componentes de la formulación semisólida queden adheridos al material de sílice y por tanto, no se liberen en las condiciones del estudio. Sin embargo, se necesitan más estudios para identificar dichos componentes.

También se compararon los espectros de las muestras procedentes del material de sílice cargado, en función del pH. Como cabría esperar dada la composición del sistema cargado, los resultados muestran que ambos espectros son similares y que, en consecuencia, no existen diferencias en la liberación de estos componentes en función del pH del medio.

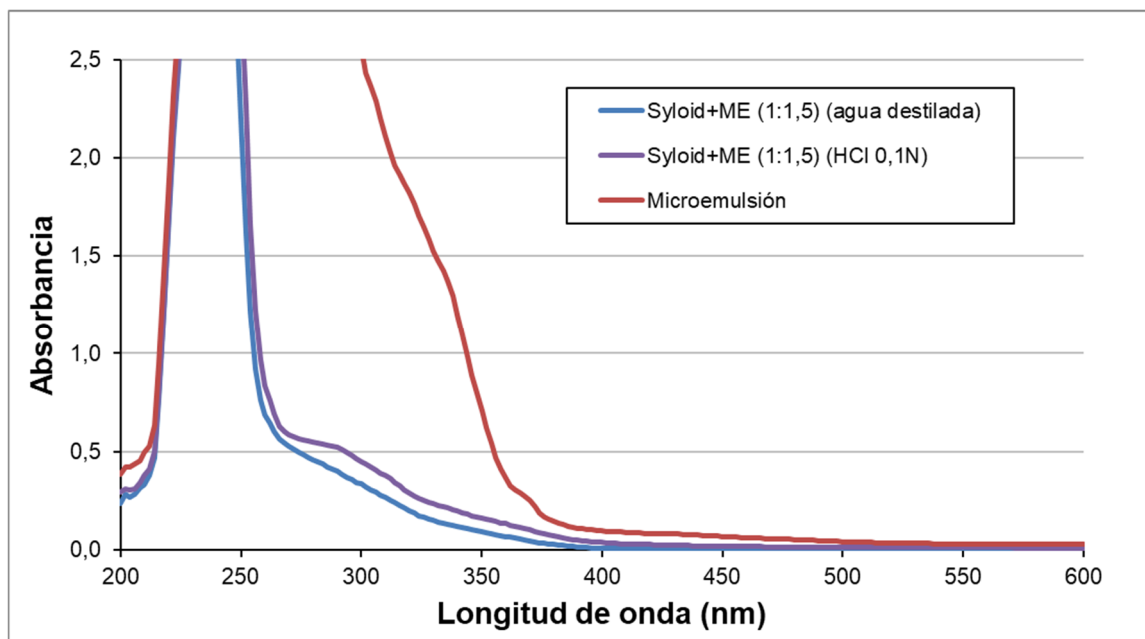


Figura 4.26. Espectros del estudio de dispersión.

Los resultados de este estudio nos permitieron definir un rango entre 200 y 300 nm para analizar la cinética de liberación de la microemulsión previamente cargada en el material de sílice.

4.2.2.2. Cinéticas de liberación a partir del material de sílice.

Debido a la complejidad de la composición del extracto de *A. absinthium*, no ha sido posible desarrollar un método espectrofotométrico capaz de relacionar el contenido del extracto con un valor de absorbancia. Por tanto, se ha considerado la absorbancia máxima, detectada a los 30 minutos, como un valor de referencia, sobre el que se han estimado las absorbancias relativas. De este modo, aunque no es posible determinar la cantidad máxima de microemulsión que va a liberar el sistema, es posible analizar el tipo de cinética de liberación (Figura 4.27).

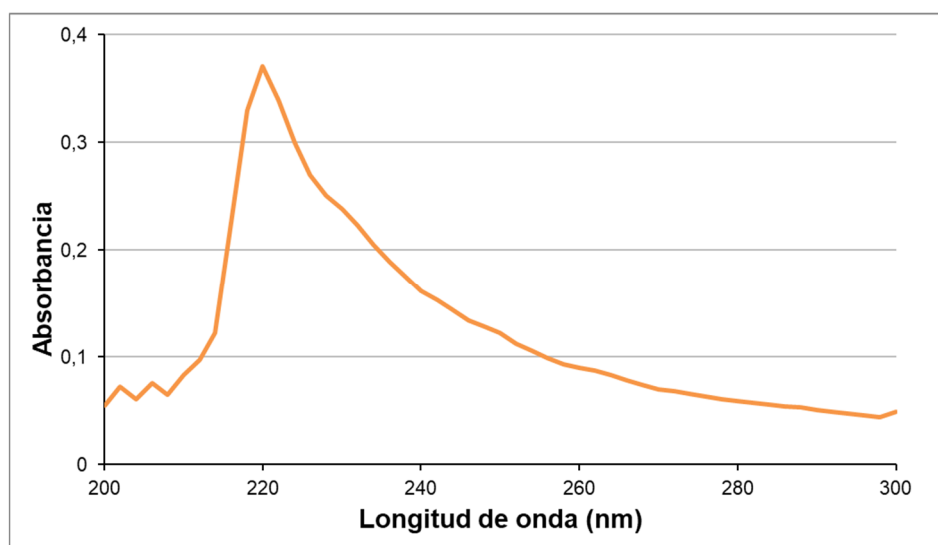


Figura 4.27. Espectro de absorción de una muestra del estudio de velocidad de dispersión a los 30 minutos.

Las absorbancias y las absorbancias relativas procedentes del estudio de dispersión de la microemulsión del extracto de *A. absinthium* respecto del tiempo se presentan en la Tabla 4.22. A partir de estos resultados, se calcularon la ED y el TMD como parámetros amodelísticos (Tabla 4.23.) y se evaluaron cinco cinéticas de disolución para racionalizar el proceso (Tabla 4.24.). Asimismo, los resultados del estudio se han representado gráficamente en la Figura 4.28. Se observa que a los 4 minutos del ensayo se ha liberado prácticamente la totalidad de la formulación líquida disponible en el interior del material poroso.

Tabla 4.22. Resultados del ensayo de dispersión del sistema formado por Syloid® y la microemulsión de extracto de *A. absinthium*.

Tiempo (minutos)	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Media	S(n-1)
	Abs.	Abs. relativa (%)	Abs.	Abs. relativa (%)	Abs.	Abs. relativa (%)		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0
1	0,138	12,976	0,101	9,501	0,041	4,399	8,959	4,314
4	1,046	98,393	0,918	86,359	0,678	72,747	85,833	12,831
7	1,063	100,000	0,996	93,697	0,797	85,515	93,071	7,263
13	1,064	100,119	1,010	95,014	0,802	86,052	93,728	7,121
16	1,065	100,179	1,052	98,965	0,872	93,562	97,569	3,522
20	1,066	100,298	1,063	100,000	0,917	98,391	99,563	1,026
30	1,070	100,655	1,078	101,411	0,932	100,000	100,689	0,706

Abreviaturas: Abs: absorbancia.

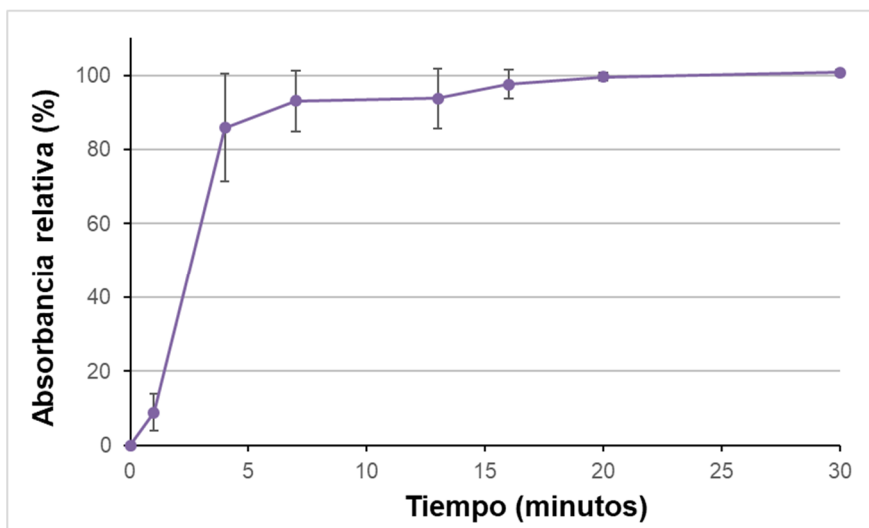


Figura 4.28. Microemulsión liberada del material de sílice en función del tiempo (Valores medios \pm IC95%) (n=3).

Tabla 4.23. Tiempo medio de disolución (TMD) y eficacia de disolución (ED).

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	S (n-1)	IC 95%
TMD (min)	2,224	3,193	4,847	3,421	1,327	1,501
ED (%)	91,986	88,114	83,843	87,981	4,073	4,609

Tabla 4.24. Resultado del ajuste de diferentes cinéticas.

Parámetros	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Modelo de Weibul	Modelo de Higuchi	Modelo de Hixson-Crowell
Pendiente	2,9164	-0,2385	1,2327	19,8808	-0,1671
Ordenada	39,2518	4,3074	-0,8013	14,7704	3,9677
Coefficiente de correlación	0,7171	0,9553	0,9387	0,8659	0,9444
Coefficiente de determinación (R^2)	0,5143	0,9127	0,8811	0,7498	0,8919
Coefficiente de determinación (R^2) ajustado	0,4333	0,8952	0,8514	0,7082	0,8739
Número de datos	8	7	6	8	8

Debido a que el ajuste a la cinética de primer orden presenta el coeficiente de determinación más elevado (0,8952), se considera que la cinética de cesión de la microemulsión sigue una cinética de orden 1, siendo la constante de liberación 0,2385 minutos⁻¹. Este resultado muestra que la microemulsión se libera proporcionalmente a la cantidad que se encuentra en el interior poroso del material de sílice. El 50% de la microemulsión disponible se libera a 1,6288 minutos.

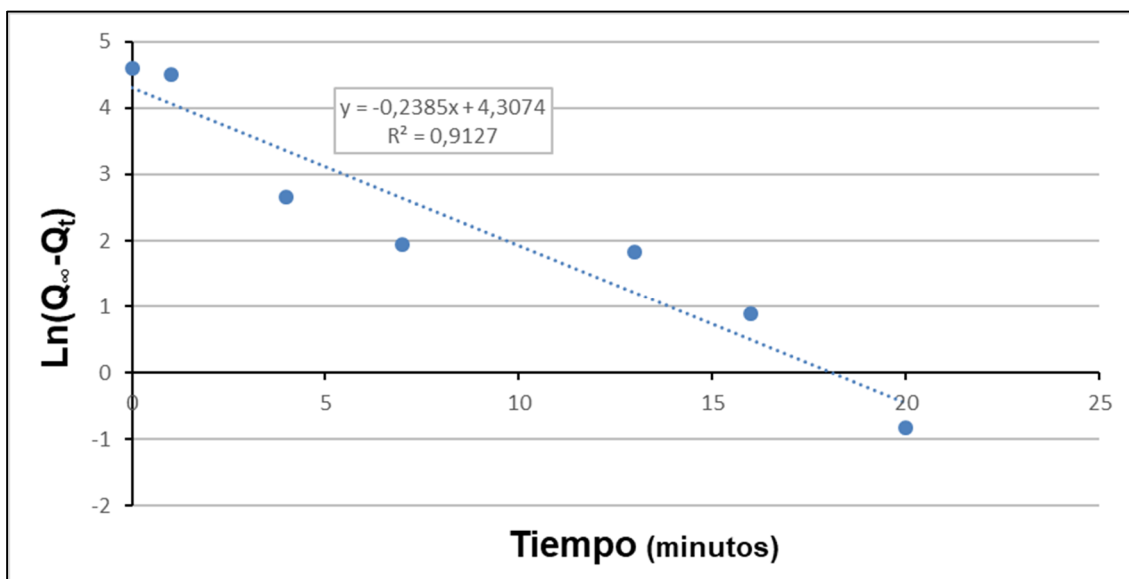


Figura 4.29. Cinética de primer orden de la liberación de la microemulsión a partir del material de sílice.

4.2.3. Estabilidad y comparativa de las cinéticas de liberación de la microemulsión.

Se analizó la estabilidad de la microemulsión cargada en el material de sílice tras un periodo de reposición (25°C/60% HR). En las mismas condiciones del estudio de velocidad de disolución, se analizó la cinética de liberación a los 15 y a los 90 días de la preparación del sistema, comprando los resultados con los obtenidos a tiempo inicial (24 horas después de su preparación). Los experimentos de dispersión se realizaron por triplicado.

4.2.3.1. Resultados a los 15 días de reposición.

Al igual que en los experimentos anteriores, se estimó la absorbancia relativa respecto de la absorbancia máxima del sistema. Los resultados indican que la microemulsión disponible se libera a los 20 minutos (Tabla 4.25 y Figura 4.30).

Tabla 4.25. Resultados de absorbancia a los 15 días de preparación del sistema.

Tiempo (minutos)	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Abs. relativa media (%)	S(n-1)
	Abs.	Abs. relativa (%)	Abs.	Abs. relativa (%)	Abs.	Abs. relativa (%)		
0	0,000	0,000	0	0,000	0	0,000	0	0,000
1	0,000	0,000	0,266	31,405	0,066	7,491	12,965	16,402
4	0,556	62,613	0,656	77,450	0,323	36,663	58,908	20,644
7	0,670	75,450	0,721	85,124	0,639	72,531	77,702	6,591
10	0,691	77,815	0,771	91,027	0,678	76,958	81,933	10,883
13	0,741	83,446	0,815	96,222	0,754	85,585	88,417	3,909
16	0,763	85,923	0,847	100,000	0,842	95,573	93,832	7,198
20	0,885	99,662	0,835	98,583	0,881	100,000	99,415	0,740
30	0,888	100,000	0,838	98,937	0,875	99,319	99,419	0,538

Abreviatura: Abs: absorbancia.

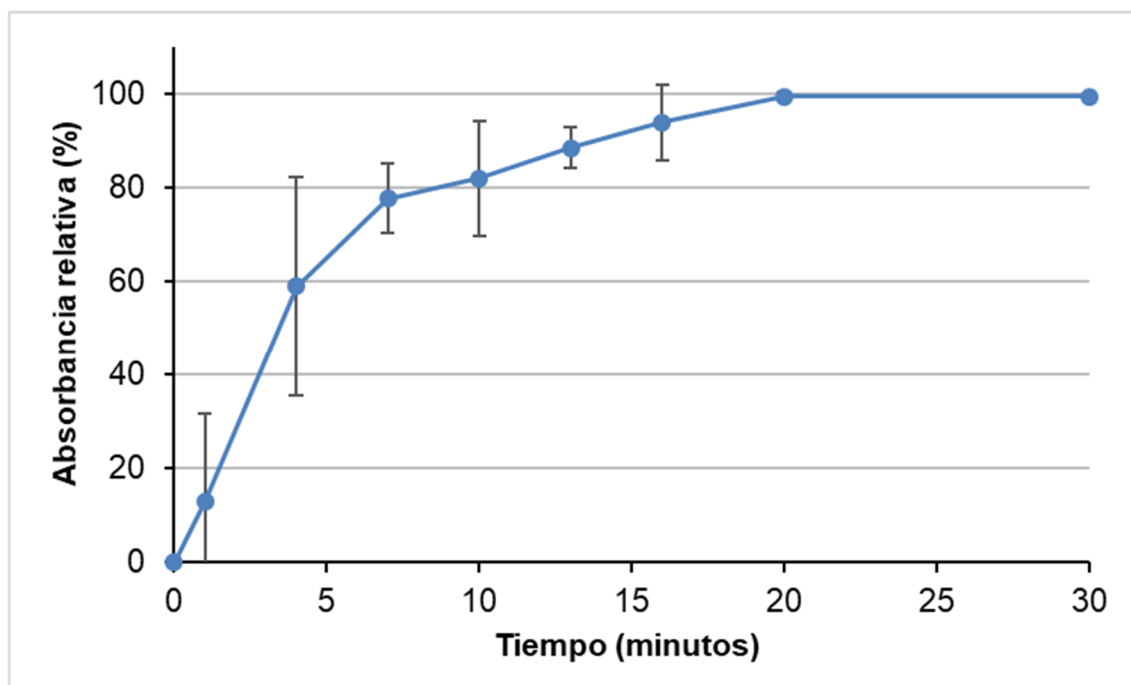


Figura 4.30. Cinética de liberación de la microemulsión tras 15 días de su inclusión en el material de sílice. Valores medios \pm IC95% (n=3).

En la Tabla 4.26 se muestran los TMD y la ED en cada muestra, así como los resultados medios y el IC al 95%.

Tabla 4.26. Tiempo medio de disolución (TMD) y eficacia de disolución (ED) a los 15 días de preparación.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	S (n-1)	IC 95%
TMD (min)	6,037	3,211	6,183	5,143	1,675	1,896
ED (%)	79,878	89,183	79,250	82,770	5,562	6,294

Como en el apartado anterior, diferentes modelos cinéticos fueron ajustados a los resultados obtenidos experimentalmente. Al igual que en condiciones iniciales, la cinética de primer orden presenta el mejor ajuste a los resultados experimentales (0,9790), siendo la constante de liberación $-0,1686 \text{ minutos}^{-1}$ (Tabla 4.27). Por tanto, el tiempo de reposición (15 días) no afecta a la cinética de liberación de la microemulsión. El tiempo de liberación del 50% de la microemulsión disponible es 3,6538 minutos.

Tabla 4.27. Resultado del ajuste de diferentes cinéticas después de 15 días de la preparación del sistema.

Parámetros	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Modelo de Weibul	Modelo de Higuchi	Modelo de Hixson-Crowell
Pendiente	3,1137	-0,1686	1,0659	25,5245	-0,1761
Ordenada	33,1232	4,5225	-0,7922	-0,7413	4,4245
Coefficiente de correlación	0,8141	0,9912	0,9873	0,9762	0,9839
Coefficiente de determinación (R^2)	0,6628	0,9825	0,9748	0,9530	0,9681
Coefficiente de determinación (R^2) ajustado	0,6146	0,9790	0,9706	0,9436	0,9627
Número de datos	9	7	8	7	8

4.2.3.2. Resultados a los 90 días de reposición.

Las absorbancias relativas se presentan en las Tabla 4.28 y Figura 4.31. De forma similar al apartado anterior, la mayor parte de la microemulsión disponible se liberó a los 20 minutos.

Tabla 4.28. Resultados de absorbancia a los 90 días de reposición.

Tiempo (minutos)	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Abs. relativa media (%)	S (n-1)
	Abs.	Abs. relativa (%)	Abs.	Abs. relativa (%)	Abs.	Abs. relativa (%)		
0	0	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,157	48,457	0,175	45,337	0,166	47,770	47,188	1,639
4	0,240	74,074	0,323	83,679	0,282	81,007	79,587	4,957
7	0,263	81,173	0,356	92,228	0,310	89,065	87,489	5,694
10	0,268	82,716	0,368	95,337	0,318	91,511	89,855	6,471
13	0,279	86,111	0,386	100,000	0,333	95,683	93,932	7,108
16	0,295	91,049	0,384	99,482	0,340	97,698	96,076	4,444
20	0,304	93,827	0,383	99,223	0,344	98,849	97,300	3,013
30	0,324	100,000	0,371	96,114	0,348	100,000	98,705	2,244

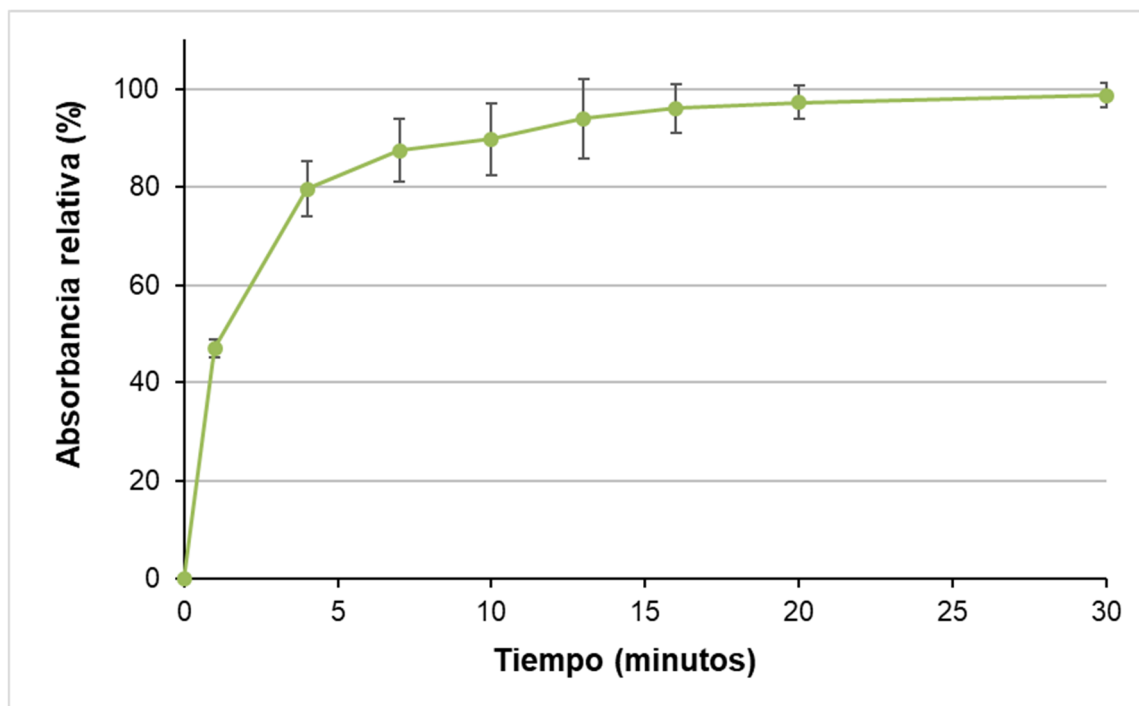


Figura 4.31. Cinética de liberación de la microemulsión tras 90 días de su inclusión en el material de sílice. Valores medios \pm IC95% (n=3).

En las Tabla 4.29 y Tabla 4.26 se muestran el TMD y la ED de cada muestra, así como los resultados medios y el IC al 95%.

Tabla 4.29. Tiempo medio de disolución (TMD) y eficacia de disolución (ED) a los 90 días de preparación.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	S (n-1)	IC 95%
TMD (min)	4,554	1,557	2,988	3,033	1,499	1,696
ED (%)	84,820	94,600	90,041	89,820	4,894	5,538

Diferentes modelos cinéticos se ajustaron a los resultados obtenidos experimentalmente. El modelo de Weibull presentó el mejor ajuste a los resultados experimentales (0,9921) (Tabla 4.30). Por tanto, el tiempo de reposición en este caso influyó en la cinética de liberación de la microemulsión disponible, que presentó una tendencia similar a las curvas de velocidad de disolución que suelen mostrar los comprimidos convencionales. El 63,2% de la microemulsión disponible se liberó a los 2,0356 minutos.

Tabla 4.30. Resultado del ajuste de diferentes cinéticas después de 90 días de la preparación del sistema.

Parámetros	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Modelo de Weibull	Modelo de Higuchi	Modelo de Hixson-Crowell
Pendiente	2,3723	-0,1682	0,5592	16,7885	-0,1045
Ordenada	50,0582	4,0675	-0,1726	27,5038	3,5611
Coefficiente de correlación	0,7028	0,9690	0,9966	0,8811	0,8766
Coefficiente de determinación (R^2)	0,4939	0,9390	0,9932	0,7763	0,7684
Coefficiente de determinación (R^2) ajustado	0,4216	0,9288	0,9921	0,7444	0,7354
Número de datos	9	7	8	9	9

4.2.3.3. Comparativa

Los resultados obtenidos a tiempo inicial y tras 15 y 90 días de reposición se comparan a continuación. Los perfiles de velocidad de disolución se han recalculado, considerando la absorbancia máxima alcanzada en las muestras iniciales (1,027 UA).

Los resultados muestran que, tras 15 días de reposición, la absorbancia de las muestras del estudio de dispersión disminuye un 85,03%, respecto de la absorbancia de las muestras iniciales (Figura 4.32). Asimismo, las muestras del sistema a los 90 días de reposición alcanzan absorbancias incluso inferiores; siendo la absorbancia máxima equivalente al 34,08% de la absorbancia registrada a tiempo inicial.

Estos resultados indican que el tiempo desde que se ha incluido la microemulsión en el material de sílice retrasa la liberación de la formulación líquida. De este modo, al constante de disolución estimada a tiempo inicial ($-0,2385 \text{ minutos}^{-1}$) es superior a la constante registrada a los 15 días de reposición ($-0,1686 \text{ minutos}^{-1}$) (Tabla 4.24 y Tabla 4.27). Este efecto puede estar relacionado con una mayor adherencia de la microemulsión a la superficie de los poros del material de sílice.

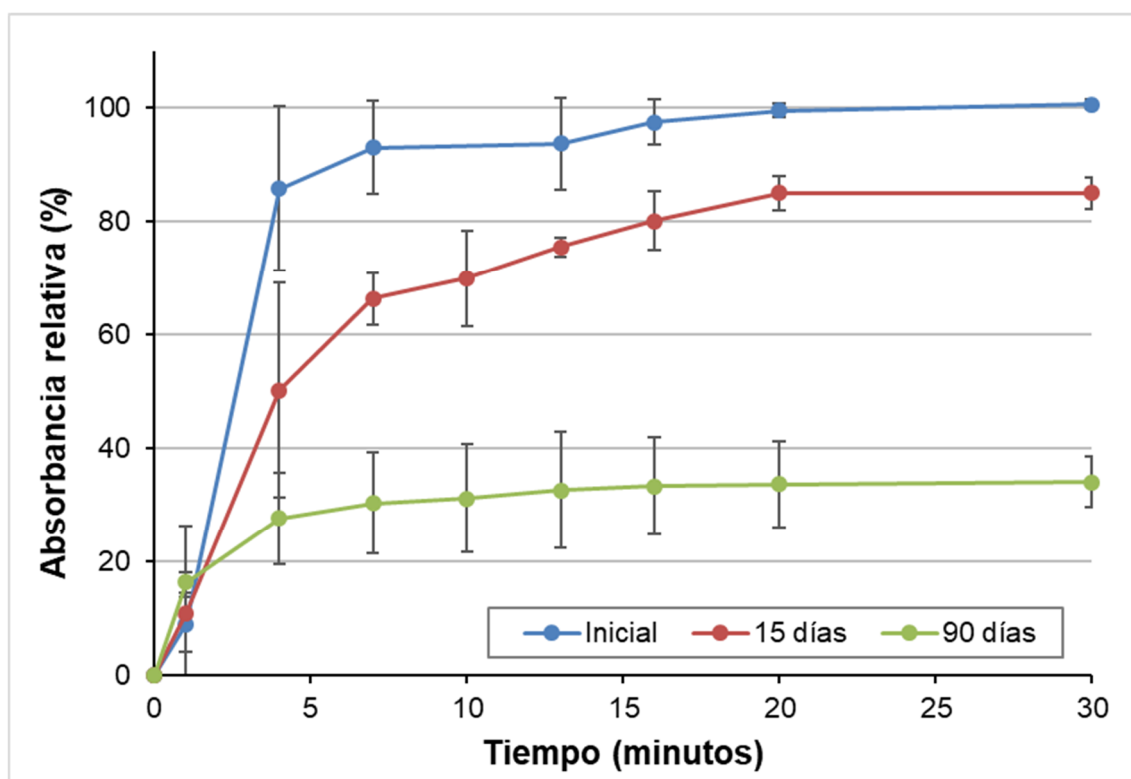


Figura 4.32. Perfil de dispersión de la emulsión de *A. absinthium* procedente del sistema cargado a tiempo inicial, a los 15 días y 90 días de preparación. Valores medios \pm IC95% (n=3).

También se han comparado los TMD y las ED a tiempo inicial y tras 15 y 90 días de reposición, estimando el valor de p para cada condición (Figura 4.33 y Tabla 4.31). Se observa que los valores de p son mayores de 0,05 y que, por tanto, no existen diferencias en el TMD ni en la ED entre las preparaciones. Por tanto, el tiempo de reposición no influye en la cinética de liberación de la microemulsión disponible. Sin embargo, cabe destacar que el tiempo de reposición reduce la cantidad de microemulsión disponible, disminuyendo la absorbancia máxima alcanzada al final de los estudios de dispersión.

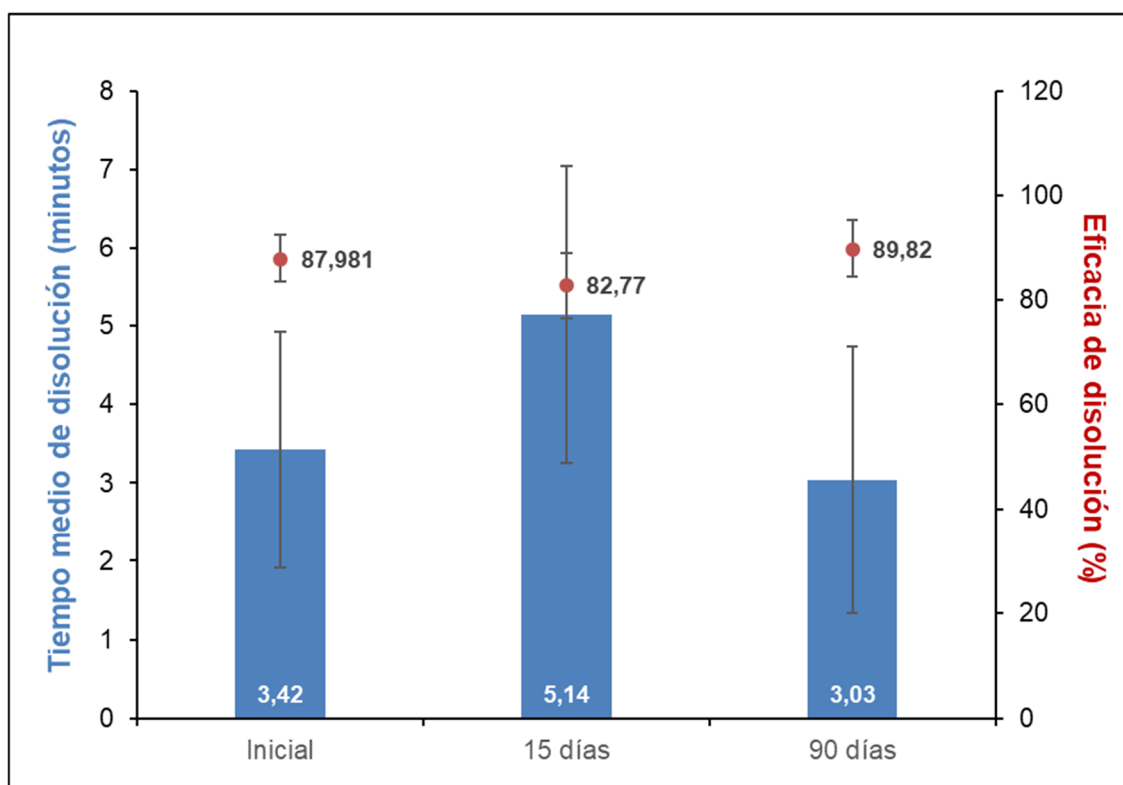


Figura 4.33. Comparación de la eficacia de disolución y de los tiempos medios de disolución en el tiempo inicial, a los 15 y a los 90 días de reposición. Valores medios \pm IC95% (n=3).

Tabla 4.31. Valores de p calculados para cada condición: inicial, a los 15 y a los 90 días de reposición.

Valores de p	TMD			ED		
	Inicial	15 días	90 días	Inicial	15 días	90 días
Inicial	-	0,4659	0,5877	-	0,4902	0,6693
15 días	0,4659	-	0,3028	0,4902	-	0,3138
90 días	0,5877	0,3028	-	0,6693	0,3138	-

Abreviaturas: ED: eficacia de disolución; TMD: tiempo medio de disolución.

4.2.4. Estudio de la compactabilidad y compresión del material de sílice cargado.

Los parámetros de flujo del material de sílice vacío y cargado con la microemulsión se muestran en la Tabla 4.32. Como se observa, el material de sílice cargado presenta una mayor densidad, índice de compresibilidad e índice de Hausner que el material vacío. De acuerdo a la clasificación de la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013), el flujo del material de sílice vacío se clasifican como “Bueno”, mientras que el Syloid® XDP cargado con la microemulsión

presenta propiedades “Adecuadas”. En cuanto al ángulo de reposo, ambos presentan propiedades de flujo “Excelentes”.

Tabla 4.32. Parámetros de flujo del material de sílice vacío y cargado con la microemulsión. Valores medios (n=3).

	Syloid® XDP			Syloid® XDP: ME (1:1,5)		
	Media	S (n-1)	IC 95%	Media	S (n-1)	IC 95%
Densidad aparente (g/mL)	0,281	0,000	0,000	0,729	0,029	0,040
Densidad compactada (g/mL)	0,319	0,000	0,000	0,882	0,028	0,039
Índice de compresibilidad	12,000	0,000	0,000	17,216	3,291	4,560
Índice de Hausner	1,136	0,000	0,000	1,210	0,049	0,068
Ángulo de reposo (°)	26,589	1,142	1,001	21,608	2,636	2,311

Abreviatura: ME: microemulsión.

4.2.3.1. Selección del aglomerante, del contenido en aglomerante y de la fuerza de compresión.

Se fabricaron 10 comprimidos con cada formulación indicada en la Tabla 3.4 a diferentes fuerzas de compresión (10, 12 y 15 kN). Los comprimidos mostraron un aspecto verde amarillento, debido al color del extracto de *A. absinthium* formulado en microemulsión e incorporado en el material de sílice. El aspecto de los comprimidos se observa en la Figura 4.34.

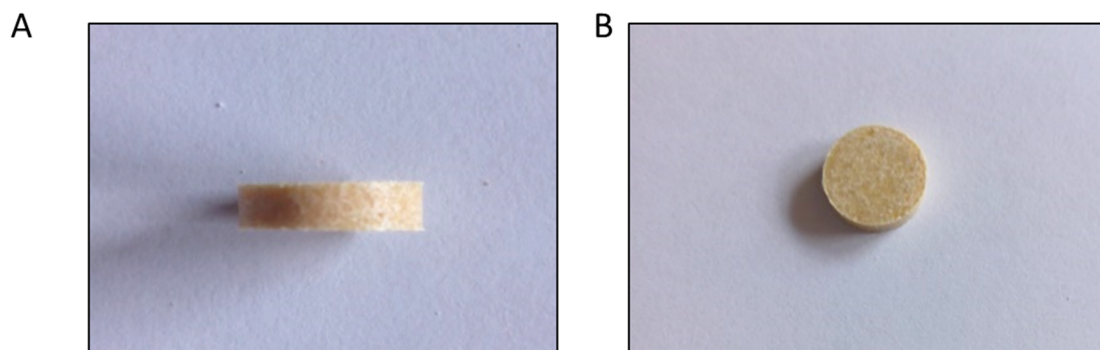


Figura 4.34. Aspecto de los comprimidos: altura (A) y diámetro (B).

Las características de los comprimidos fueron similares para cada formulación: peso medio \pm DE 0,231 \pm 0,005 g; 9,095 \pm 0,007 mm de diámetro \pm DE y 2,852 \pm 0,096 mm de altura. La altura de los comprimidos presentó mayores variaciones como consecuencia de las variaciones en la fuerza de compresión. En general, la aplicación de mayores fuerzas de compresión dio lugar a comprimidos con menor altura.

La fuerza tensil de los comprimidos de cada formulación respecto de su fuerza de compresión se muestran en la Tabla 4.33, indicando el valor mínimo, máximo, la media, desviación e intervalo de confianza para cada condición. Asimismo, los resultados medios se han representado en las Figura 4.35 y Figura 4.36.

Tabla 4.33. Fuerza tensil de las formaciones con diferente aglomerante y fuerza de compresión (n=10).

Fuerza de compresión (kN)	Peso medio (g)	Diám. medio (mm)	Altura media (mm)	Dureza media (N)	Fuerza tensil (MPa)				
					Mín.	Máx.	Media	S(n-1)	IC 95%
Almidón pregelatinizado (10,0% p/p)									
10 kN	0,227	9,090	2,880	29,362	0,473	0,933	0,714	0,128	0,079
12 kN	0,225	9,083	2,878	29,735	0,486	0,973	0,723	0,155	0,096
15 kN	0,232	9,100	2,790	28,305	0,547	0,892	0,688	0,100	0,062
PVP (10,0% p/p)									
10 kN	0,177	9,105	2,495	25,236	0,593	1,194	0,745	0,182	0,113
12 kN	0,187	9,097	2,537	30,403	0,677	0,973	0,839	0,106	0,066
15 kN	0,168	9,100	2,077	32,350	0,778	1,302	1,056	0,174	0,108
PVP (15,0% p/p)									
12 kN	0,168	9,080	2,330	36,456	0,837	1,444	1,143	0,180	0,112
15 kN	0,175	9,100	2,330	44,388	0,783	1,691	1,333	0,289	0,179
PVP (26,5% p/p)									
12 kN	0,164	9,110	2,277	62,011	1,436	2,162	1,854	0,217	0,135
15 kN	0,236	9,100	3,150	91,378	1,742	2,320	2,026	0,171	0,106

Abreviaturas: diám.: diámetro; mín.: mínimo; máx.: máximo; PVP: polivinilpirrolidona.

Como se observa, los comprimidos que contienen PVP presentan un aumento de la fuerza tensil a medida que aumenta el contenido en este aglomerante. Sin embargo, no se observan diferencias en la fuerza tensil de los comprimidos formados por almidón pregelatinizado, y ninguno de ellos llega a alcanzar una fuerza tensil mínima de 1 MPa (Chen et al., 2016). En base a estos resultados se decidió continuar los experimentos con PVP como aglomerante seco.

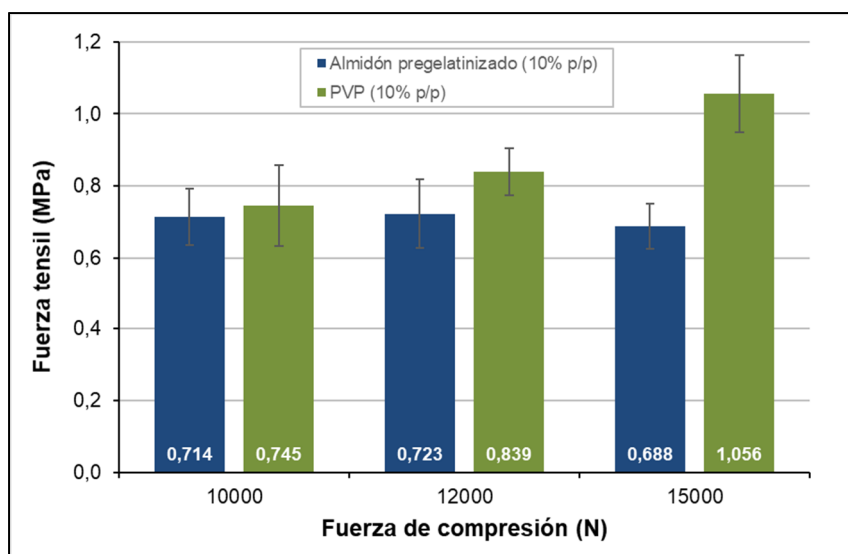


Figura 4.35. Fuerza tensil con diferentes aglomerantes. Valores medios \pm IC95% (n=10).

La PVP fue incorporada en los comprimidos a diferentes concentraciones, 10% p/p, 15% p/p y 26,5% p/p (Tabla 4.33 y Figura 4.36). Al igual que en la experiencia anterior, se observa que la fuerza tensil aumenta con el incremento en el contenido de aglomerante y la fuerza de compresión.

La fuerza tensil mínima (1 MPa) (Chen et al., 2016) se alcanzó a partir de concentraciones de 10% p/p de PVP, tras aplicar una fuerza de compresión de 15 kN, siendo la fuerza tensil máxima de 2,06 MPa. En base a estos resultados, se seleccionó la formulación que da lugar a comprimidos con la fuerza tensil mínima, con la menor fuerza de compresión, es decir, aquella con un 15% de p/p PVP y una fuerza de compresión de 12 kN (Figura 4.36).

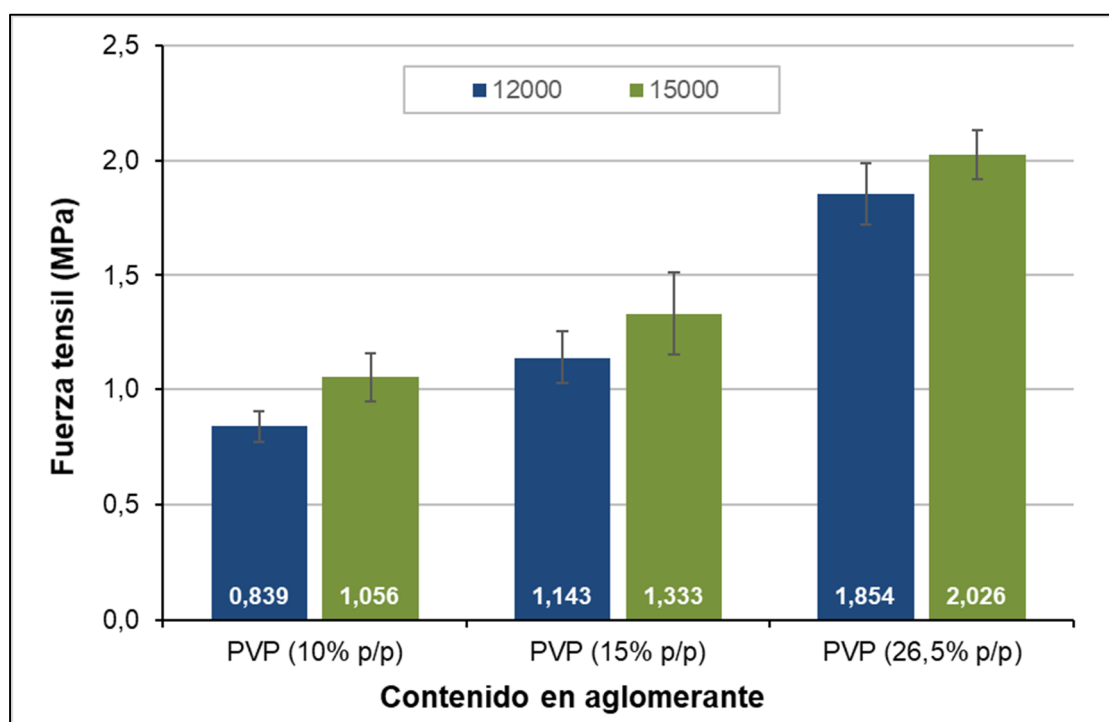


Figura 4.36. Fuerza tensil a diferentes fuerzas de compresión. Valores medios \pm IC95% (n=10).

4.2.4. Caracterización de una formulación en comprimidos.

En la Tabla 4.34 se presenta la composición de los experimentos estimados mediante el diseño de mezclas del programa Design Expert®. Como se observa, algunos

de los experimentos presentan la misma composición, con el objetivo de evaluar las características del modelo.

El índice de compresibilidad de las formulaciones se encuentra entre 5,498 y 21,052; y el índice de Hausner entre 1,059 y 1,267. En general, todas las formulaciones presentan propiedades de flujo clasificadas como “Excelente”, “Buena” o “Adecuada” (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013). En cuanto al ángulo de reposo, los resultados varían entre 6,811° y 25,321°. Se observa que el índice de compresibilidad y el índice de Hausner tienen mayor capacidad para evaluar las características de flujo de las mezclas pulverulentas (Tabla 4.34).

Como cabía esperar, las formulaciones con menor contenido en Syloid® 244 (experimentos 10 y 12) presentaron peores propiedades de flujo respecto al resto de formulaciones, mientras que el experimento 8, con un alto contenido en el agente deslizante (1% p/p) mostró un flujo “Adecuado”. Estos resultados muestran que las formulaciones con menor contenido en Syloid® 244 fluyen peor; sin embargo, la presencia de altas concentraciones de este excipiente no aseguran buenas propiedades de flujo debido a la presencia de otros excipientes como celulosa microcristalina y croscarmelosa, que reducen la capacidad reológica del polvo como consecuencia de su carácter fibroso (Rowe, 2009). No obstante, los resultados de ángulo de reposo muestran que las formulaciones tienen unas propiedades de flujo “Excelentes” (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013), y que pueden ser comprimidas utilizando un procedimiento de compresión directa (Swarbrick, 2007).

Tabla 4.34. Composición y resultados de los experimentos del diseño experimental (n=3).

Exp.	Composición (% p/p)						Índice de compresibilidad			Índice de Hausner			Ángulo de reposo (°)		
	Syloid® XDP:ME (1:1.5)	CMC	PVP	Cros.	Syloid® 244	Estearato magnésico	Media	S (n-1)	IC 95%	Media	S (n-1)	IC 95%	Media	S (n-1)	IC 95%
1	42,89	29,76	19,41	5,94	1,00	1,00	9,783	2,977	2,609	1,109***	0,037	0,032	15,557***	2,399	2,715
2	56,53	40,00	0,00	2,19	0,73	0,56	11,111	0,000	0,000	1,125**	0,000	0,000	19,769***	0,709	0,803
3	52,23	23,09	20,00	3,41	0,66	0,62	15,808	2,976	3,368	1,189*	0,041	0,047	23,277***	2,525	2,858
4	42,69	39,90	15,67	0,00	0,75	0,99	11,003	2,803	3,171	1,124**	0,035	0,039	16,400***	1,318	1,492
5	52,23	23,09	20,00	3,41	0,66	0,62	5,498	2,976	3,368	1,059***	0,033	0,037	15,536***	6,192	7,006
6	36,16	39,67	16,69	6,00	0,66	0,82	21,052	0,000	0,000	1,267*	0,000	0,000	23,739***	2,664	3,015
7	46,99	40,00	5,10	6,00	0,91	1,00	11,111	0,000	0,000	1,125**	0,000	0,000	6,811***	3,750	4,243
8	53,92	29,60	14,49	0,00	0,99	1,00	16,667	0,000	0,000	1,200*	0,000	0,000	11,567***	5,099	5,770
9	55,55	30,94	5,52	6,00	1,00	1,00	15,000	0,000	0,000	1,176**	0,000	0,000	24,739***	0,589	0,666
10	60,00	24,03	11,74	3,29	0,08	0,86	18,182	0,000	0,000	1,222*	0,000	0,000	24,103***	1,105	1,251
11	48,58	35,89	11,23	3,03	0,52	0,75	7,692	0,000	0,000	1,083***	0,000	0,000	25,321**	1,547	1,751
12	60,00	24,03	11,74	3,30	0,08	0,86	16,667	0,000	0,000	1,200*	0,000	0,000	24,467***	2,453	2,775
13	48,25	30,29	16,10	3,38	0,99	0,99	12,281	3,039	3,439	1,141**	0,040	0,046	21,510***	0,635	0,719
14	42,69	39,90	15,67	0,00	0,75	0,99	20,455	0,000	0,000	1,257*	0,000	0,000	24,848***	3,188	3,607
15	56,52	40,00	0,00	2,19	0,73	0,56	12,500	0,000	0,000	1,143**	0,000	0,000	18,801***	0,186	0,210
16	36,16	39,67	16,70	6,00	0,66	0,82	11,538	0,000	0,000	1,130**	0,000	0,000	21,318***	1,569	1,775

Abreviaturas: Cros: croscarmelosa; Exp.: experimento; CMC: celulosa microcristalina; PVP: polivinilpirrolidona. Nota: *Adecuado; **Bueno; ***Excelente, según la clasificación de la Farmacopea Europea (Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013).

4.2.4.1. Resultados de los experimentos: fuerza tensil.

Las características de los comprimidos formados por las formulaciones del diseño experimental y los resultados de los análisis de fuerza tensil se muestran en la Tabla 4.35. Se observa que el peso, diámetro y altura de los comprimidos fueron similares en las diferentes formulaciones. La dureza de los comprimidos presentó un rango entre 11,134 y 88,275 N, dando lugar a fuerzas tensiles de entre 0,388 y 2,703 MPa.

Tabla 4.35. Resultados de fuerza tensil de las formulaciones del diseño experimental (n=10).

Exp.	Peso medio (g)	Diámetro medio (mm)	Altura media (mm)	Dureza media (N)	Fuerza tensil (MPa)				
					Mínimo	Máximo	Media	S (n-1)	IC 95%
1	0,171	9,056	2,225	65,209	1,821	2,291	2,052	0,171	0,106
2	0,161	9,075	2,013	11,134	0,347	0,434	0,388	0,026	0,016
3	0,173	9,069	2,288	88,233	2,146	3,317	2,703	0,356	0,220
4	0,173	9,050	2,250	71,262	2,136	2,375	2,229	0,068	0,042
5	0,170	9,075	2,194	78,406	1,819	2,966	2,510	0,393	0,224
6	0,176	9,086	2,200	83,273	0,162	3,027	2,652	0,162	0,100
7	0,164	9,050	2,125	26,733	0,714	1,366	0,884	0,188	0,117
8	0,171	9,050	2,300	71,739	1,847	2,502	2,197	0,194	0,120
9	0,170	9,059	2,208	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,175	9,050	2,300	88,275	2,365	3,039	2,697	0,225	0,140
11	0,162	9,050	2,108	23,333	0,508	1,203	0,777	0,231	0,143
12	0,175	9,050	2,300	17,006	0,280	0,955	0,518	0,245	0,152
13	0,162	9,050	2,108	75,95	1,752	3,495	2,567	0,443	0,275
14	0,176	9,063	2,188	71,194	2,113	2,414	2,289	0,096	0,060
15	0,167	9,075	2,288	15,478	0,385	0,630	0,519	0,085	0,053
16	0,174	9,050	2,240	82,723	2,314	3,094	2,603	0,206	0,128

Debido a que los experimentos se estimaron utilizando un diseño lineal, los resultados no se pudieron analizar con modelos más complejos. Sin embargo, el modelo lineal presentó un buen ajuste ($R^2=0,9158$), siendo el valor de PRESS (1,75) y con una relación adecuada entre el valor predicho de R^2 (0,8097) y el valor de R^2 ajustado (0,8690). La precisión adecuada del modelo fue 12,34, que al ser mayor de 4, indica que el modelo puede ser utilizado para la estimación de puntos en el área de estudio (Dean et al., 2015; Huang et al., 2004; Said et al., 2017).

Las características del modelo lineal se muestran en la Tabla 4.36. Como se observa, el valor de F es 19,578 ($p=0,0001$), lo que indica que el modelo es estadísticamente significativo. Además, la representación gráfica de los valores actual y predicho forman una diagonal recta, que corrobora estos resultados (Figura 4.38). El

gráfico de residuales de probabilidad normal forma una línea recta, indicando que se estima que siguen una distribución normal (Figura 4.39).

Tabla 4.36. Características del modelo de fuerza tensil (MPa).

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Modelo	8,434	5	1,687	19,578	0,0001
Residuales	0,775	9	0,086	-	-
Falta de ajuste	0,745	5	0,149	19,863	0,0063
Error puro	0,030	4	0,007	-	-
Suma de cuadrados corregida total	9,209	14	-	-	-

Asimismo, el análisis de Box y Cox mostró que λ alcanzaban un valor de 0,59 (IC95%: -0,27; 2,35), cercano a 1, de manera que no es necesario transformar la variable dependiente para lograr un mejor ajuste de los resultados experimentales (Myers et al., 2016). Los resultados del análisis de Box y Cox se observan en la Figura 4.37.

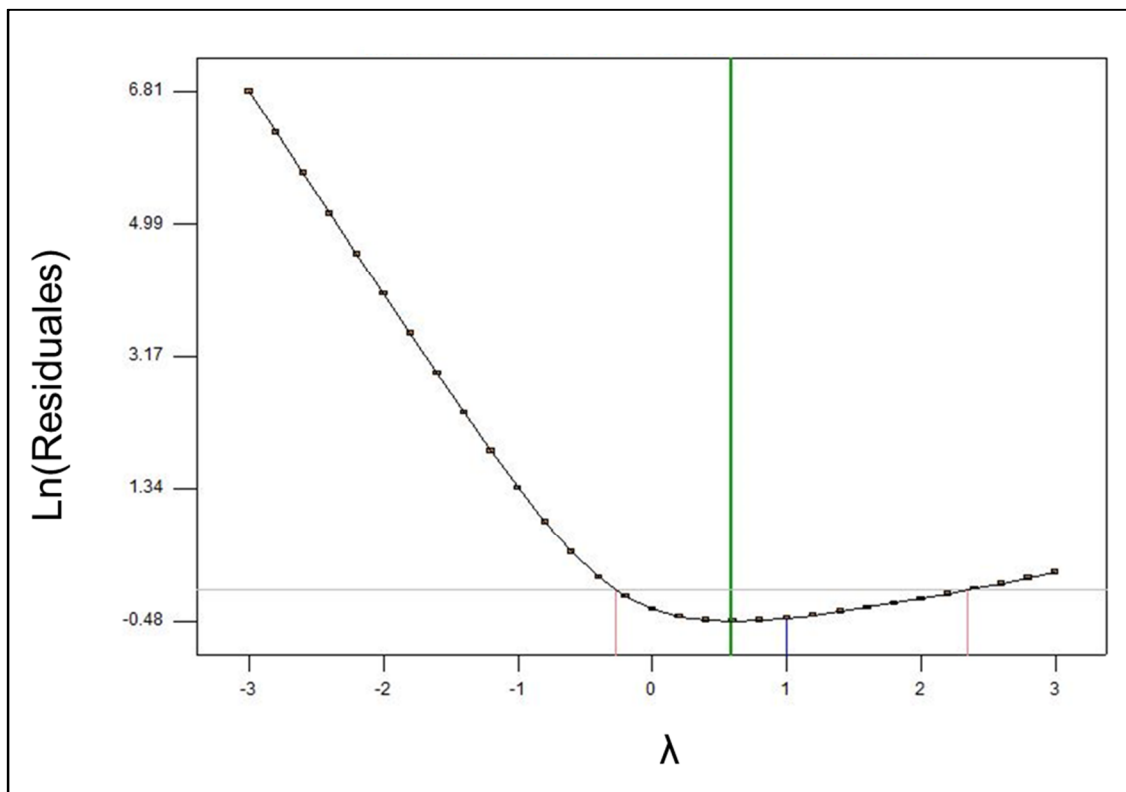


Figura 4.37. Gráfico del método Box y Cox del modelo de fuerza tensil.

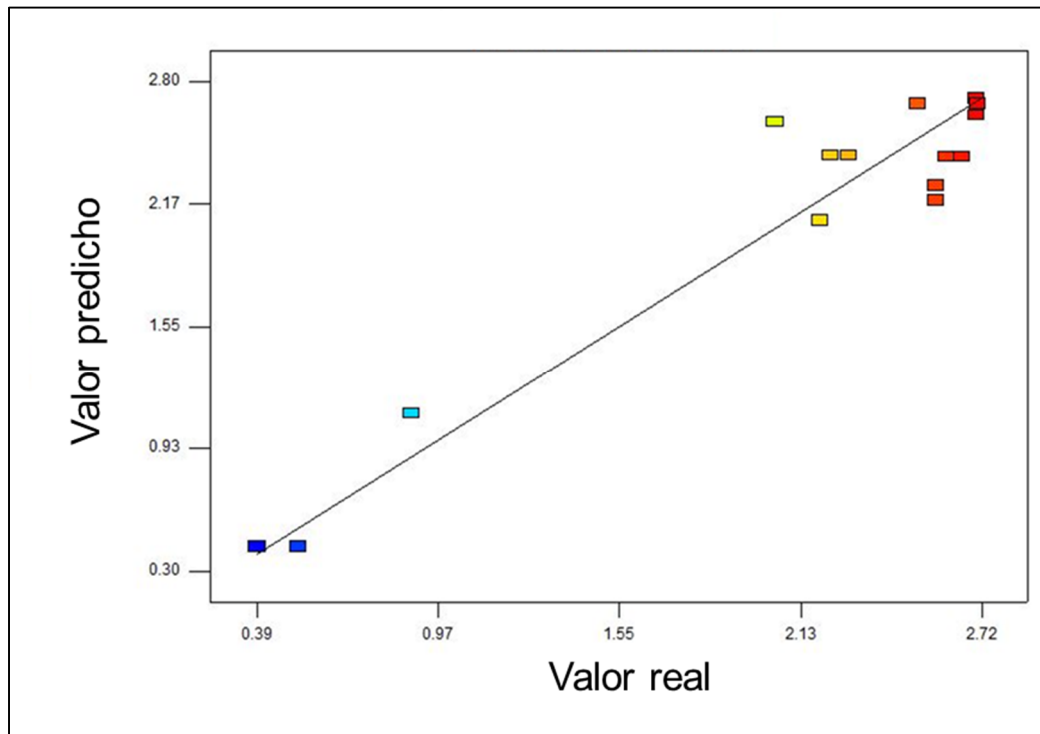


Figura 4.38. Comparación de resultados predichos y resultados actuales del modelo fuerza tensil.

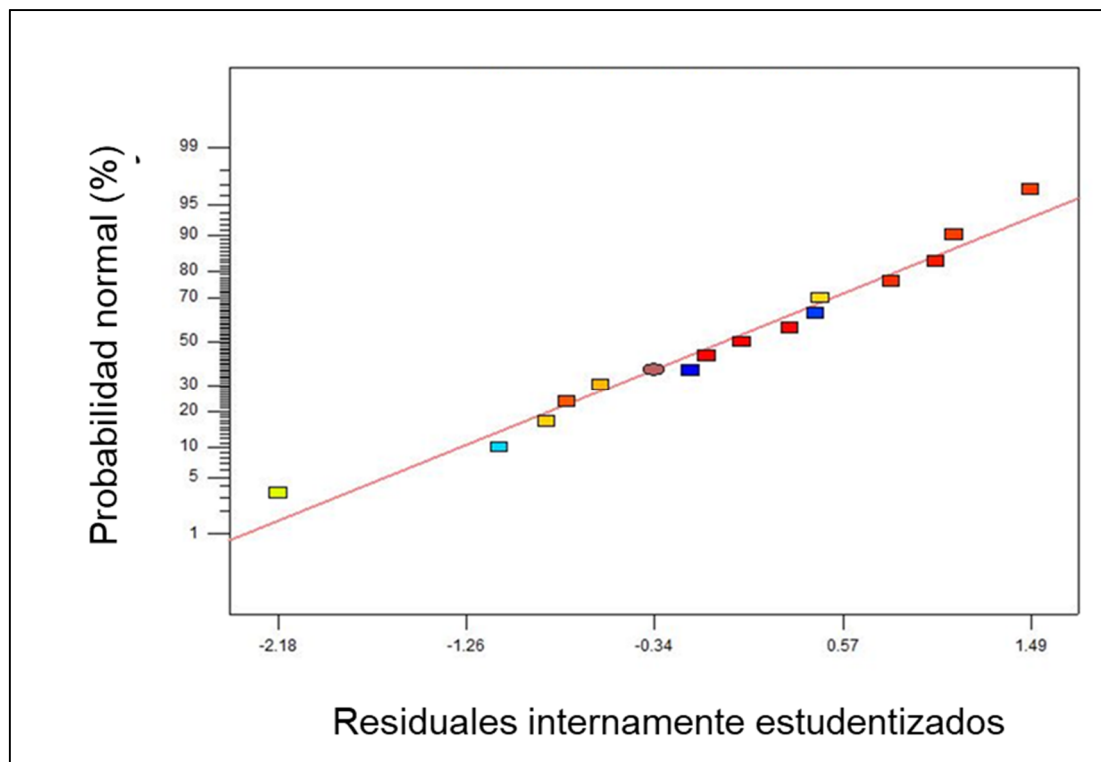


Figura 4.39. Gráfico de probabilidad normal de los residuales del modelo de fuerza tensil.

En el ANEXO se muestra la representación de los residuales estudentizados respecto de los valores predichos, del número de experimento, y de cada componente de la formulación, que siguen una distribución aleatoria, mostrando que el modelo es adecuado (Myers et al., 2016).

A partir de los resultados, se estimó la siguiente ecuación del modelo:

$$FT = 0,0094 \cdot SME + 0,0019 \cdot CMC + 0,1100 \cdot PVP + 0,0057 \cdot CCM + (-1,0560) \cdot S244 + 1,0220 \cdot EM \quad (\text{Ec.59})$$

En donde FT es la fuerza tensil en MPa; SME es la mezcla formada por Syloid® XDP:ME (1:1,5); CMC es la celulosa microcristalina; PVP es la polivinilpirrolidona; CCM es la croscarmelosa; S244 es el Syloid® 244 y EM es el esterato magnésico, medidos en porcentaje p/p.

Como en los modelos anteriores, la magnitud de cada coeficiente indica el nivel de contribución de su respectiva variable independiente a la respuesta y el signo positivo o negativo indica si el efecto se añade o se sustrae en la respuesta final (Myers et al., 2016). Por tanto, la ecuación anterior indica que los excipientes con mayor influencia en la fuerza tensil de los comprimidos son la PVP y el estearato magnésico. Como aglomerante, la PVP establece interacciones entre las partículas sólidas, mejorando la dureza de los comprimidos y, en consecuencia, su fuerza tensil (Bühler, 2010; Rowe, 2009).

El estearato magnésico suele ser indiferente o disminuir la fuerza tensil de los comprimidos (Jarosz y Parrott, 1984; Muzíková, 2002; Muzíková et al., 2016; Sheikh-salem et al., 1988). Sin embargo, nuestros resultados muestran que este excipiente incrementa la fuerza tensil en nuestras formulaciones. Este efecto puede deberse a que este lubricante, de naturaleza hidrofóbica, forma interacciones con los emulgentes de la microemulsión localizados en la superficie del material de sílice, provocando que los comprimidos sean más densos, tengan mayor dureza y en consecuencia, mayor fuerza tensil (Pingali et al., 2011).

Respecto al material de sílice, se observa que el Syloid® XDP cargado con la microemulsión tiene una influencia pequeña pero positiva en la fuerza tensil de los comprimidos. Estos resultados probablemente se deben a la presencia de la formulación

líquida en la superficie del material de sílice, que favorece la adhesión de las partículas pulverulentas y mejora la fuerza tensil de los comprimidos. Sin embargo, como cabría esperar, el dióxido de sílice coloidal (Syloid® 244) no forma estas uniones y por tanto, influye negativamente en la fuerza tensil de los comprimidos (Chen et al., 2018).

4.2.4.2. Resultados de los experimentos: tiempo de disgregación.

Las características y el tiempo de desintegración de las formulaciones de comprimidos se muestran en la Tabla 4.37. El peso de los comprimidos varió entre 0,164 y 0,178 g, mientras que el diámetro y la altura variaron entre 9,050 y 9,100 mm, y entre 2,300 y 2,500 mm, respectivamente. En cuanto al tiempo de desintegración, los resultados variaron entre 0,200 y 14,000 minutos.

Tabla 4.37. Resultados de tiempo de desintegración de las formulaciones del diseño experimental.

Experimento	Peso medio (g)	Diámetro medio (mm)	Altura media (mm)	Tiempo de desintegración (minutos)
1	0,172	9,060	2,240	5,600
2	0,173	9,050	2,250	0,300
3	0,172	9,060	2,240	5,550
4	0,174	9,050	2,240	14,000
5	0,173	9,050	2,250	9,217
6	0,178	9,100	2,250	6,400
7	0,173	9,050	2,250	0,883
8	0,164	9,050	2,300	9,417
9	0,172	9,060	2,240	1,500
10	0,174	9,050	2,240	5,667
11	0,168	9,080	2,330	7,383
12	0,169	9,050	2,240	5,667
13	0,173	9,050	2,250	7,383
14	0,172	9,060	2,240	0,383
15	0,173	9,050	2,250	0,200
16	0,175	9,100	2,330	6,950

Al igual que el modelo anterior, los experimentos se estimaron utilizando un modelo lineal, de forma que no es posible ajustar modelos más complejos a los resultados experimentales. No obstante, el modelo lineal mostró un elevado coeficiente de correlación ($R^2 = 0,9091$). Sin embargo, el valor PRESS (1130,98) fue superior respecto del valor alcanzado en el modelo de fuerza tensil, y la interacción entre el valor predicho R^2 (0,8334) y el valor ajustado (0,6351) no fue tan cercano como en el modelo anterior (Tabla 4.36). A pesar a estos resultados, la precisión adecuada (8,230) es superior a 4, de

forma que el modelo es adecuado para la estimación de valores en el área de estudio (Dean et al., 2015; Huang et al., 2004; Said et al., 2017).

Los parámetros estadísticos del modelo se muestran en la Tabla 4.38. Se observa que el valor de F es 12,008 y el valor de p, 0,004, lo que implica que el modelo es significativo. La relación entre los valores predichos y los reales se observa en la Figura 4.41. Asimismo, el gráfico de probabilidad normal indica que los residuales siguen una distribución normal (Figura 4.42).

Tabla 4.38. Características del modelo de tiempo de desintegración (min/g).

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Model	2817,964	5	563,593	12,008	0,004
Residuales	281,603	6	46,934	-	-
Falta de ajuste	52,593	3	17,531	0,230	0,871
Error puro	229,010	3	76,337	-	-
Suma de cuadrados corregida total	3099,567	11	-	-	-

El valor de λ en el análisis de Box y Cox alcanzó un valor de 0,39 (IC95%: -0,11; 1,06), cercano a 1, de manera que no es necesario transformar la variable dependiente para lograr un mejor ajuste de los resultados experimentales (Myers et al., 2016) (Figura 4.40).

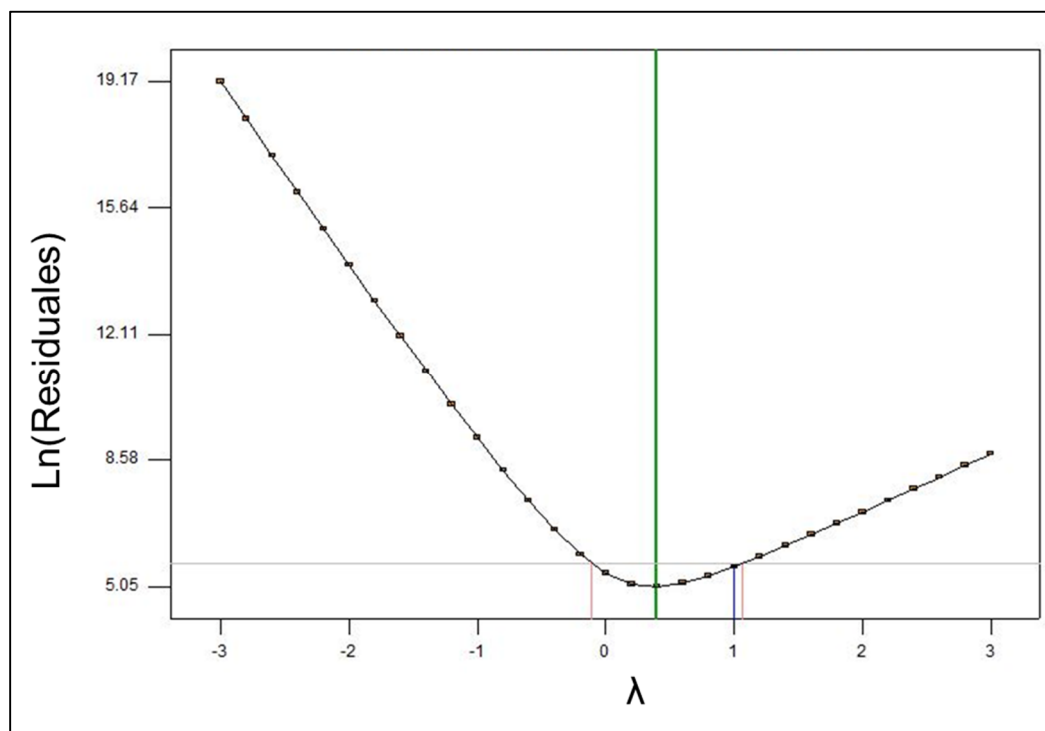


Figura 4.40. Gráfico del método Box y Cox del modelo de tiempo de desintegración.

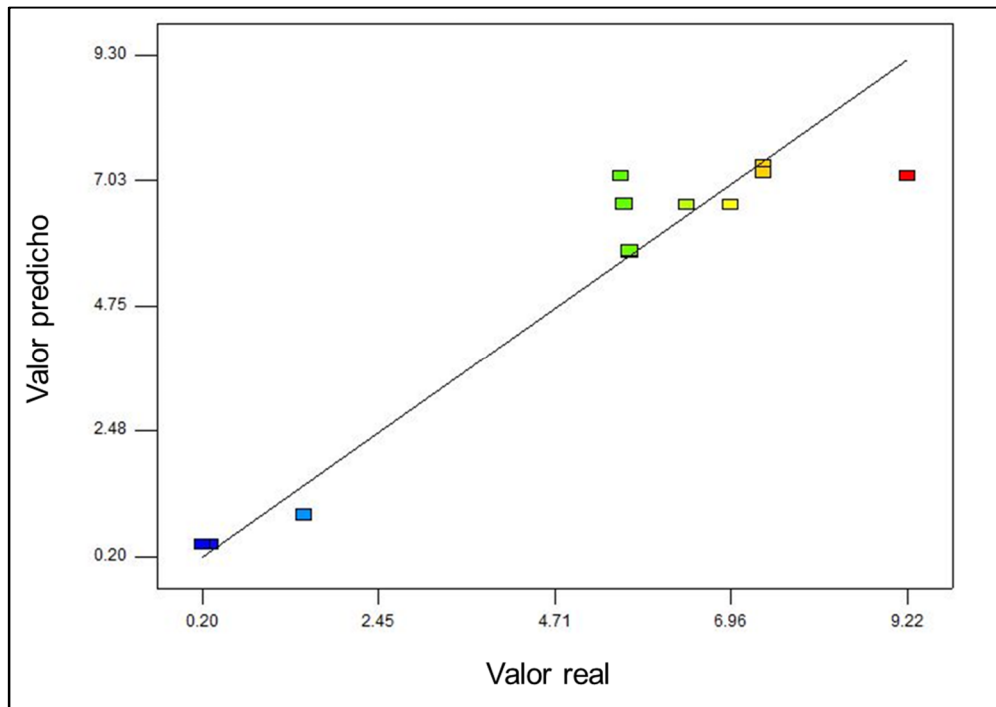


Figura 4.41. Comparación de resultados predichos y resultados actuales del modelo de tiempo de desintegración.

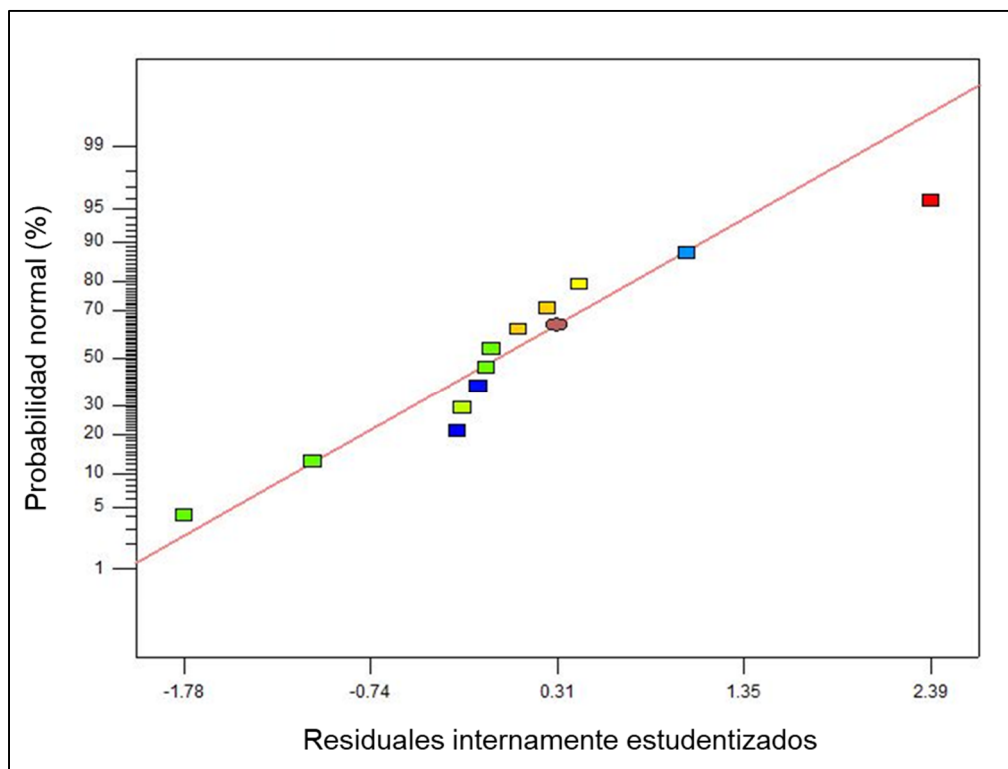


Figura 4.42. Gráfico de probabilidad normal de los residuales del modelo de tiempo de desintegración.

En el ANEXO se muestra la representación de los residuales estudentizados respecto de los valores predichos, del número de experimento, y de cada componente de

la formulación, que al igual que en los modelos anteriores, siguen una distribución aleatoria, de forma que el modelo es adecuado (Myers et al., 2016).

Estos resultados permitieron estimar la siguiente ecuación del modelo:

$$TD = -0,0465 \cdot SME + 0,1038 \cdot CMC + 0,4498 \cdot PVP + (-0,9391) \cdot CCM + (-2,2973) \cdot S244 + 4,6572 \cdot EM \quad (\text{Ec. 60})$$

En donde TD es el tiempo de desintegración en minutos; SME es la mezcla formada por Syloid[®] XDP:ME (1:1,5); CMC es la celulosa microcristalina; PVP es la polivinilpirrolidona; CCM es la croscarmelosa; S244 es el Syloid[®] 244 y EM es el estearato magnésico, medidos en porcentaje p/p.

Esta ecuación muestra que los excipientes que aceleran la desintegración de los comprimidos son la croscarmelosa y el Syloid[®] 244. La croscarmelosa es un superdisgregante, de forma que reduce el tiempo de desintegración del comprimido en medios acuosos, y por tanto, acelera la liberación del fármaco (Ferrero et al., 1997; Rowe, 2009). Syloid[®] 244 también disminuye el tiempo de desintegración, probablemente debido a su baja compactabilidad (Wang et al., 2010).

Por otro lado, la PVP aumenta el tiempo de desintegración, al incrementar la fuerza tensil de los comprimidos (Bühler, 2010; Rowe, 2009). Se observa que aunque el contenido de PVP en nuestras formulaciones (0% - 20% p/p) superan las cantidades recomendadas para la formulación de comprimidos (1% - 5% p/p) (Bühler, 2010), mejora la fuerza tensil, alcanzando valores adecuados (Chen et al., 2016). Además, el incremento en el tiempo de compresión debido a la incorporación de esta concentración de PVP, se equilibra por el efecto de la croscarmelosa sódica.

Por otro lado, el estearato magnésico muestra una elevada influencia positiva en el tiempo de desintegración, debido a su carácter lipófilo, que reduce la humectabilidad del comprimido. Un menor tiempo de mezclado puede reducir esta influencia (Pingali et al., 2011; Rowe, 2009; Swarbrick, 2007).

4.2.4.3. Optimización de una formulación en comprimidos.

Los resultados anteriores permitieron optimizar la formulación en comprimidos del Syloid[®] XDP cargado con la microemulsión del extracto de *A. absinthium*. La

formulación optimizada estaba formada por Syloid® XDP:ME (1:1,5) (49,71% p/p), CMC PH102 (33,56% p/p), PVP (12,55% p/p), croscarmelosa sódica (3,03% p/p), Syloid® 244 FP (0,59% p/p) y estearato magnésico (0,56% p/p) (Figura 4.43), con un nivel de deseabilidad de 0,699.

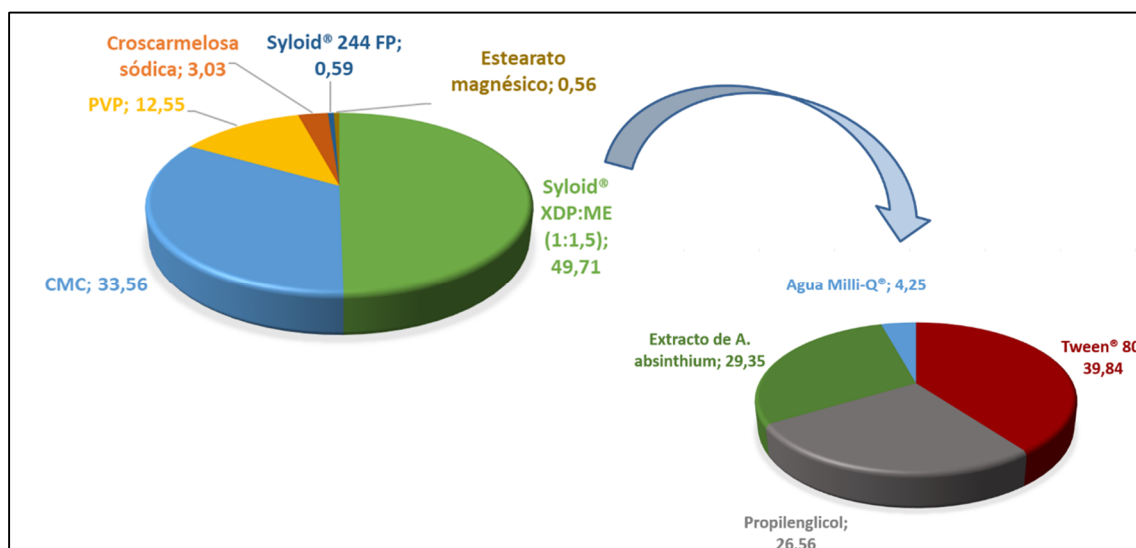


Figura 4.43. Composición de la formulación de comprimidos optimizada (% p/p).

El modelo estimó que la fuerza tensil teórica de la formulación optimizada sería 1,89 MPa (IC95%: 1,53 – 2,26), con un tiempo de desintegración de 5,24 (IC95%: 3,63 – 6,85) minutos. La formulación optimizada fue analizada posteriormente en el laboratorio y los resultados mostraron que la fuerza tensil alcanzaba 2,03 MPa (IC95%: 1,65 – 2,42) MPa, mientras que el tiempo de disgregación fue 3,8 minutos. La comparación entre los resultados teóricos y experimentales se muestra en la Tabla 4.39 y en la Figura 4.44.

Tabla 4.39. Resultados teóricos y experimentales de la formulación optimizada.

	Resultados teóricos	Resultados experimentales
Peso medio (g)	-	0,165
Diámetro medio (mm)	-	2,272
Altura media (mm)	-	9,050
Dureza media (N)	-	75,193
Fuerza tensil (MPa)		
Mínimo	-	1,109
Máximo	-	2,800
Media	1,890	2,035
S (n-1)	-	0,565
IC 95%	1,530 – 2,260	1,685 – 2,385
Error estándar relativo (%)	7,461	
Tiempo de desintegración (minutos)		
Media*	5,240	
IC 95%	3,630 – 6,850	-
Error estándar relativo (%)	27,431	

Nota: *Tiempo de desintegración del último comprimido analizado (n=6).

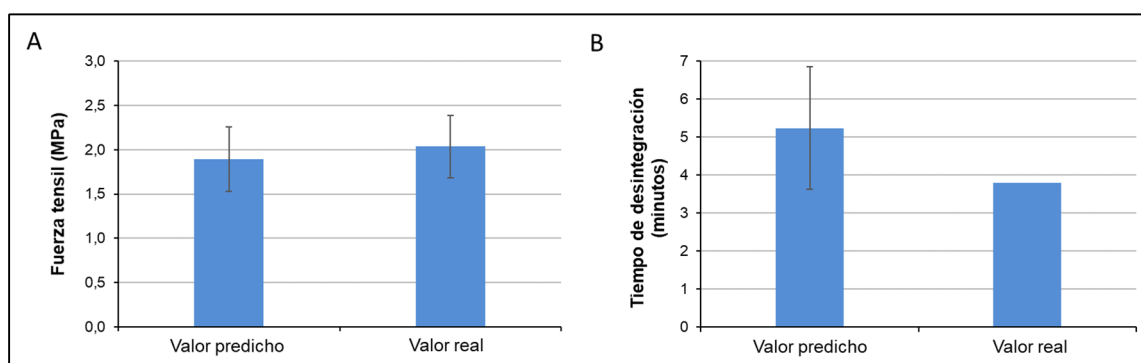


Figura 4.44. Comparativa de la fuerza tensil (A) y el tiempo de desintegración (B).

Los resultados entre el valor predicho o estimado por el modelo y el valor obtenido experimentalmente, se compararon utilizando el ERR. En los resultados de fuerza tensil, el valor de ERR predicho y el valor real fue del 7,46%, mientras que, en el modelo de tiempo de desintegración, este parámetro fue 27,43%. Esta diferencia puede deberse a que el modelo de fuerza tensil presenta una mayor precisión que el modelo de tiempo de desintegración, y por tanto, permite un mejor ajuste de los datos experimentales (Tabla 4.39).

A su vez, esta diferencia en la precisión de los modelos puede deberse a que la influencia de los excipientes en el tiempo de desintegración es más compleja respecto del efecto de los excipientes en la fuerza tensil de los comprimidos. Por ello, un diseño cuadrático podría presentar un mejor ajuste respecto de un modelo lineal. Sin embargo,

dado el elevado número de componentes de la formulación en comprimidos, el desarrollo de un modelo cuadrático hubiera requerido el planteamiento y la realización de un mayor número de formulaciones, requiriendo un mayor consumo de recursos.

Nuestro experimento da lugar a una mezcla pulverulenta que, tras aplicar una fuerza de compresión de 12 kN, forma comprimidos con una fuerza tensil de 2 MPa. Aunque no es posible comparar la fuerza de compresión aplicada por diferentes equipos (Diarra et al., 2015), podemos afirmar que nuestra fuerza de compresión es inferior a la que utilizaron Choudhari et al. en sus investigaciones (20 kN), para formar comprimidos con una fuerza tensil cercana a 1,6 MPa (Choudhari et al., 2014b). Estas diferencias pueden deberse a que nuestra formulación contiene una mayor cantidad de aglomerante (12,55% p/p) respecto de la desarrollada por Choudhari et al. (10,00% p/p). Por tanto, como cabría esperar, un mayor contenido en aglomerante aumenta el tiempo de desintegración, de forma que nuestros comprimidos requieren más tiempo para desintegrarse (3,8 minutos) respecto de su formulación (1 minuto).

También cabe destacar que la formulación optimizada contiene una mayor cantidad de sílice cargada con la formulación (49,71% p/p) respecto de la formulación diseñada por Choudhari et al. (40,00% p/p). Además, debido a que el material de sílice que ellos utilizan está cargado en una proporción 1:1 p/p (Syloid® XDP: vitamina E), la formulación líquida incluida en los comprimidos es inferior a la cantidad alcanzada en nuestra formulación (20,00% p/p vs 29,83% p/p de microemulsión, que contiene 29,35% p/p de extracto de *A. absinthium*).

Este estudio muestra una metodología para optimizar una formulación en comprimidos utilizando un material de sílice cargado con una formulación líquida, mediante un procedimiento de compresión directa. El proceso ha consistido en el desarrollo de diferentes etapas: 1) la incorporación de la formulación líquida al material de sílice, 2) la selección de excipientes adecuados, 3) la optimización de la formulación en comprimidos y 4) la comparación de los resultados teóricos con resultados experimentales.

Nuestros resultados muestran que los diseños de mezclas constituyen una alternativa prometedora para mejorar la formulación de comprimidos formados por materiales de sílice cargados, ya que cuantifican el efecto de los excipientes en las

propiedades de los comprimidos. Los modelos lineales permiten conocer estas interacciones y la influencia de los componentes en la variable dependiente. No obstante, este estudio se puede completar con futuras investigaciones, que contemplen la caracterización completa de los comprimidos en base a los requisitos establecidos por la farmacopea respecto a la friabilidad, uniformidad de contenido, la liberación de la formulación líquida, así como la actividad nematocida del extracto vegetal.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Los resultados mostraron que la combinación formada por el emulgente Tween[®] 80 y el coemulgente propilenglicol en proporción 1,5:1 p/p constituye una mezcla adecuada para formular el extracto de *A. absinthium*, alcanzando un área de microemulsion del 30,81%, con respecto al área total constituido por el diagrama pseudoternario.
2. Se confirmó que las medidas de viscosidad y conductividad del sistema nos han permitido identificar con precisión diferentes microestructuras, en función de la composición de la mezcla, siendo capaces de identificar las microemulsiones de fase externa oleosa y de fase externa acuosa definidas, así como sistemas bicontínuos.
3. El diseño de experimentos permitió desarrollar y optimizar una microemulsion en función del tamaño de gotícula. La formulación optimizada está formada por 66,40% p/p de Tween[®] 80 y propilenglicol (1,5:1 p/p); 29,35% p/p del extracto de *A. absinthium* y 4,25% p/p de agua. El diámetro medio de Sauter de la formulación optimizada estimado por el modelo fue 1,1836 nm (IC 95%: 0,71 – 1,99), similar a los resultados obtenidos experimentalmente, originándose un sistema de fase externa acuosa o bicontínuo.
4. Los resultados del modelo experimental sugieren que el extracto de *A. absinthium* y el agua son los componentes más influyentes en el tamaño de gotícula (medido como el diámetro medio de Sauter). Se estima que la mayor parte de los experimentos analizados, incluida la formulación optimizada, originan una estructura bicontínua, en donde los compuestos que constituyen el extracto de *A. absinthium* se disponen en lamelas. Por tanto, no es posible identificar glóbulos de fase oleosa y los que se detectan son muy pequeños (0,87 nm). Sin embargo, el incremento del contenido de la fase acuosa provoca la ruptura de las estructuras lamelares dando lugar a gotículas de tamaños mayores, cercanos a 100 nm.
5. La microemulsion optimizada presentó una viscosidad media de 0,0739 Pa·s a 25° C. A pesar del carácter oleoso de la formulación, su dispersión en agua dio lugar a gotículas con un diámetro medio de Sauter cercano a 50 nm, lo que supone una

mejora potencial de la biodisponibilidad del extracto de *A. absinthium* en el medio intestinal.

6. La disolución de la microemulsión optimizada del extracto de *A. absinthium* hasta una concentración de 0,05 % v/v mejoró la eficacia nematocida respecto de una disolución con la misma concentración del extracto ($p=0,0033$), en un modelo experimental *ex vivo*, utilizando larvas L1 de *T. spiralis*. Por tanto, el desarrollo de una microemulsión permitió incorporar una mayor concentración del extracto vegetal, facilitando su dosificación y eficacia en el medio intestinal.
7. La incorporación de la microemulsión a un material de sílice permitió su solidificación y posterior formulación en comprimidos. Se estimó que la liberación de la microemulsión disponible a partir del material de sílice sigue una cinética de primer orden, siendo la constante de liberación $0,2385 \text{ minutos}^{-1}$. Por tanto, la microemulsión se libera proporcionalmente a la cantidad que se encuentra en el interior del material de sílice.
8. Los resultados obtenidos tras la reposición -en condiciones de $25^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR}$ - del material de sílice cargado a los 15 y a los 90 días, muestran una disminución en las absorbancias del 85,03% y del 34,08% respectivamente, en comparación con la absorbancia registrada a tiempo inicial. Sin embargo, futuras investigaciones deben confirmar si este efecto está relacionado con la estabilidad del extracto vegetal.
9. El diseño de mezclas permitió optimizar una formulación en comprimidos a partir del material de sílice cargado, en la que cada comprimido es capaz de contener 29,83% p/p de microemulsión, que a su vez está formada por 29,35% p/p de extracto de *A. absinthium*. Como cabría esperar, los resultados mostraron que la PVP es el componente que más contribuye a la fuerza tensil, mientras que la croscarmelosa sódica reduce en mayor medida el tiempo de desintegración.
10. Los diseños de mezclas constituyen un procedimiento alternativo prometedor para el diseño y desarrollo de formulaciones líquidas y sólidas, ya que permiten seleccionar de forma eficiente los excipientes más adecuados para la formulación de los principios activos. Este procedimiento estadístico es especialmente útil para la formulación de principios activos con escasa disponibilidad. Esta estrategia nos

ha permitido desarrollar con éxito diversas formulaciones para la vehiculización del extracto, lo que supone una alternativa prometedora a los tratamientos antiparasitarios actuales, así como una herramienta que puede ser usada en otros tipos de sustancias activas.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M.J., Bedoya, L.M., Apaza, L., Bermejo, P., 2012. The artemisia L. Genus: a review of bioactive essential oils. *Mol. Basel Switz.* 17, 2542–2566. <https://doi.org/10.3390/molecules17032542>
- Abdel-Hafez, S.M., Hathout, R.M., Sammour, O.A., 2018. Curcumin-loaded ultradeformable nanovesicles as a potential delivery system for breast cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 167, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.051>
- Adamson, A.W., 1969. A model for micellar emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 29, 261–267. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(69\)90195-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(69)90195-7)
- Adediran, O.A., Uwalaka, E.C., 2015. Effectiveness Evaluation of Levamisole, Albendazole, Ivermectin, and Vernonia amygdalina in West African Dwarf Goats. *J. Parasitol. Res.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/706824>
- AEMPS, 2004. Ficha Técnica Eskazole(R) [citado 19 de agosto de 2019]. Disponible en:
- Affandi, M.M.R.M.M., Effendi, T.J.B.E., Majeed, A.B.A., 2012. Enhanced oral bioavailability of astaxanthin with droplet size reduction. *Food Sci. Technol. Res.* 18, 549–554. <https://doi.org/10.3136/fstr.18.549>
- Agencia Europea de Medicamentos, 2018. Guideline on the quality of water for pharmaceutical use.
- Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Medina-Franco, J.L., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Hernández-Luis, F., Hernández-Campos, A., 2013. Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data. *J. Mol. Graph. Model.* 41, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.01.007>
- Alinaghi, A., Tan, A., Rao, S., Prestidge, C., 2015. Impact of Solidification on the Performance of Lipid-based Colloidal Carriers: Oil-based versus Self-emulsifying Systems. *Curr. Drug Deliv.* 12, 16–25. <https://doi.org/10.2174/1567201811666140716122644>
- Alvarez, L.I., Imperiale, F.A., Sánchez, S.F., Murno, G.A., Lanusse, C.E., 2000. Uptake of albendazole and albendazole sulfoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* 94, 75–89.
- Alvarez, L.I., Mottier, M.L., Lanusse, C.E., 2007. Drug transfer into target helminth parasites. *Trends Parasitol.* 23, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.003>
- Alvarez, L.I., Mottier, M.L., Sánchez, S.F., Lanusse, C.E., 2001. Ex vivo diffusion of albendazole and its sulfoxide metabolite into *ascaris suum* and *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 87, 929–934.
- Ariño, A., Arberas, I., Renobales, G., Arriaga, S., Domínguez, J.B., 1999. Seasonal Variation in Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oil Composition. *J. Essent. Oil Res.* 11, 619–622. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701226>
- Armstrong, N.A., 2006. Experimental designs for mixtures, in: *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation*. Taylor & Francis, Boca Ratón, pp. 189–208.
- Bailén, M., 2008. Nuevos agentes de control parasitario y vectorial. Universidad de Zaragoza.
- Bailen, M., Julio, L.F., Díaz, C.E., Sanz, J., Martínez-Díaz, R.A., Cabrera, R., Burillo, J., Gonzalez-Coloma, A., 2013. Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different

- environmental conditions. *Ind. Crops Prod.* 49, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.055>
- Balakrishnan, P., Lee, B.-J., Oh, D.H., Kim, J.O., Lee, Y.-I., Kim, D.-D., Jee, J.-P., Lee, Y.-B., Woo, J.S., Yong, C.S., Choi, H.-G., 2009. Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 374, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.03.008>
- Barot, B.S., Parejiya, P.B., Patel, H.K., Gohel, M.C., Shelat, P.K., 2012. Microemulsion-Based Gel of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis: Optimization of Formulation Using D-Optimal Design. *AAPS PharmSciTech* 13, 184–192. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9742-7>
- Basalious, E.B., Shawky, N., Badr-Eldin, S.M., 2010. SNEDDS containing bioenhancers for improvement of dissolution and oral absorption of lacidipine. I: Development and optimization. *Int. J. Pharm.* 391, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.008>
- Baser, K.H.C., Buchbauer, G., Karlsen, J., 2015. Encapsulation and Other Programmed Release Techniques for Essential Oils and Volatile Terpenes, in: *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, Second Edition. CRC Press, Boca Ratón, pp. 1023–1032.
- Bateringhe, A., Radutiu, A.C., Bem, M., Baratoiu, R.D., Hristea, E.-N., Constantinescu, T., 2011. Partial least squares (PLS) analysis for hydrophile-lipophile balance (HLB) of some nonionic surfactants, QSPR study. *Rev. Roum. Chim.* 56, 347–350. http://revroum.lew.ro/wp-content/uploads/2011/RRCh_4_2011/Art%2007.pdf
- Beg, S., Katare, O.P., Saini, S., Garg, B., Khurana, R.K., Singh, B., 2016. Solid self-nanoemulsifying systems of olmesartan medoxomil: Formulation development, micromeritic characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Powder Technol.* 294, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.02.023>
- Belmares, M., Blanco, M., Goddard, W.A., Ross, R.B., Caldwell, G., Chou, S.-H., Pham, J., Olofson, P.M., Thomas, C., 2004. Hildebrand and Hansen solubility parameters from Molecular Dynamics with applications to electronic nose polymer sensors. *J. Comput. Chem.* 25, 1814–1826. <https://doi.org/10.1002/jcc.20098>
- Berenguer, J.G., 2007. *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Edicions Universitat Barcelona.
- Berne, B.J., Pecora, R., 2000. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology, and physics*. Dover Publications.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S.M., Loukas, A., Diemert, D., Hotez, P.J., 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet Lond. Engl.* 367, 1521–1532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
- Birdi, K.S., 2016. Microemulsions and their applications in drug delivery, in: *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, Fourth Edition. CRC Press, pp. 583–598.
- Blackhall, W.J., Prichard, R.K., Beech, R.N., 2008. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet. Parasitol.* 152, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.001>
- Bogitsh, B.J., Carter, C.E., Oeltmann, T.N., 2013a. General Characteristics of the Nematoda, in: *Human Parasitology*. pp. 269–290.
- Bogitsh, B.J., Carter, C.E., Oeltmann, T.N., 2013b. Intestinal Nematodes, in: *Human Parasitology*. pp. 291–328.

- Bolás-Fernández, F., Rama-Iñiguez, S., Torrado, J.J., 2004. Ex Vivo Anthelmintic Activity of Albendazole-Sulphoxide Enantiomers. *J. Parasitol.* 90, 407–409. <https://doi.org/10.1645/GE-3212RN>
- Bolourchian, N., Hadidi, N., Foroutan, S.M., Shafaghi, B., 2010. Formulation and Optimization of Captopril Sublingual Tablet Using D-Optimal Design Sublingual Tablet Using D-Optimal Design. *Iran. J. Pharm. Res.* 0, 259–267.
- Boonme, P., Boonme, P., Krauel, K., Graf, A., Rades, T., Junyaprasert, V.B., 2006. Characterisation of microstructures formed in isopropyl palmitate/water/Aerosol®OT : 1-butanol (2 : 1) system. *Pharm. - Int. J. Pharm. Sci.* 61, 927–932.
- Boubaker Elandalousi, R., Akkari, H., B'chir, F., Gharbi, M., Mhadhbi, M., Awadi, S., Darghouth, M.A., 2013. *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: Chemical composition and in vitro anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 197, 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.016>
- Box, G.E.P., Cox, D.R., 1964. An Analysis of Transformations. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 26, 211–252.
- Brunton, L., Goodman, L.S., 2008. Chemotherapy of helminth infections, in: Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics. McGraw Hill Professional, pp. 695–706.
- Bühler, V., 2010. Soluble polyvinylpyrrolidone (Povidone), in: Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals: Povidone, Crospovidone and Copovidone. Springer, Berlin, pp. 5–125.
- Burillo, J., 2012. Investigación y experimentación con plantas medicinales en Aragón.
- Buruk Sahin, Y., Aktar Demirtaş, E., Burnak, N., 2016. Mixture design: A review of recent applications in the food industry. *Pamukkale Univ. J. Eng. Sci.* 22, 297–304. <https://doi.org/10.5505/pajes.2015.98598>
- Campbell, W., 1983. Anatomical pathology, in: *Trichinella and Trichinosis*. Springer Science & Business Media, Nueva York, pp. 173–208.
- Campillo, M.C. del, Vázquez, F.A.R., 2000. *Parasitología Veterinaria*.
- Candioti, L.V., De Zan, M.M., Cámara, M.S., Goicoechea, H.C., 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124, 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>
- Cao, M., Ren, L., Chen, G., 2017. Formulation optimization and ex vivo and in vivo evaluation of celecoxib microemulsion-based gel for transdermal delivery. *AAPS PharmSciTech* 18, 1960–1971. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0667-z>
- Carlisle, M.S., McGregor, D.D., Appleton, J.A., 1991. Intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunology* 74, 546–551.
- Castillo, J.A., Palomo-Canales, J., Garcia, J.J., Lastres, J.L., Bolas, F., Torrado, J.J., 1999. Preparation and Characterization of Albendazole β -Cyclodextrin Complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 1241–1248. <https://doi.org/10.1081/DDC-100102294>
- Casulli, A., 2006. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 886–890. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl329>
- Centers for Disease Control and Prevention, 2012. Trichinellosis. [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/biology.html> (accessed 9.7.17).
- Chatterjee, B., Almurisi, S.H., Dukhan, A.A.M., Mandal, U.K., Sengupta, P., 2016. Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic

- point of view. *Drug Deliv.* 23, 3639–3652. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1214990>
- Chen, L., Ding, X., He, Z., Huang, Z., Kunnath, K.T., Zheng, K., Davé, R.N., 2018. Surface engineered excipients: I. improved functional properties of fine grade microcrystalline cellulose. *Int. J. Pharm.* 536, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.060>
- Chen, Y., Wang, J., Flanagan, D.R., 2016. Particle, powder and compact characterization, in: *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. pp. 271–296.
- Chiou, W.L., Riegelman, S., 1971. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. *J. Pharm. Sci.* 60, 1281–1302. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600902>
- Choi, M.J., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S.G., Ruktanonchai, U., 2009. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. *Food Res. Int.* 42, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.011>
- Choudhari, Y., Hoefer, H., Libanati, C., Monsuur, F., McCarthy, W., 2014a. Mesoporous Silica Drug Delivery Systems, in: *Amorphous Solid Dispersions - Theory and Practice*. Springer, Nueva Jersey, pp. 665–693.
- Choudhari, Y., Reddy, U., Monsuur, F., Pauly, T., Hoefer, H., McCarthy, W., 2014b. Comparative evaluation of porous silica based carriers for lipids and liquid drug formulations. *Mesoporous Biomater* 1, 61–74.
- CITA, 2013. Un equipo español patenta nuevos plaguicidas basados en el ajeno. SINC.
- Cornell, J.A., 2002. Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data, 3rd ed. ed, Wiley series in probability and statistics. Wiley, New York.
- Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Ćurić, A., Reul, R., Möschwitzer, J., Fricker, G., 2013. Formulation optimization of itraconazole loaded PEGylated liposomes for parenteral administration by using design of experiments. *Int. J. Pharm.* 448, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.029>
- Dalvadi, H., Patel, N., Parmar, K., 2017. Systematic development of design of experiments (DoE) optimised self-microemulsifying drug delivery system of Zotepine. *J. Microencapsul.* 34, 308–318. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1324920>
- Daniel-Mwambete, K., Torrado, S., Cuesta-Bandera, C., Ponce-Gordo, F., Torrado, J.J., 2004. The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *Int. J. Pharm.* 272, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.030>
- Das, S.K., Khanam, J., Nanda, A., 2016. Optimization of preparation method for ketoprofen-loaded microspheres consisting polymeric blends using simplex lattice mixture design. *Mater. Sci. Eng. C* 69, 598–608. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.010>
- de Silva, N.R., Brooker, S., Hotez, P.J., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L., 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* 19, 547–551.
- Dean, A., Morris, M., Stufken, J., Bingham, D., 2015. *Handbook of design and analysis of experiments*. CRC press.

- Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* 12, 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Deshmukh, A., Kulkarni, S., 2014. Solid self-microemulsifying drug delivery system of ritonavir. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40, 477–487. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.768632>
- Despommier, D., Aron, L., Turgeon, L., 1975. *Trichinella spiralis*: growth of the intracellular (muscle) larva. *Exp. Parasitol.* 37, 108–116.
- Dhoot, A.S., Naha, A., JuhiPriya J, J., NehaXalxo N, N., 2018. Phase Diagrams for Three Component Mixtures in Pharmaceuticals and its Applications. *J. Young Pharm.* 10, 132–137. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.31>
- Di Monaco, R., Antonella Miele, N., Cavella, S., Masi, P., 2010. New chestnut-based chips optimization: Effects of ingredients. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.07.005>
- Diarra, H., Mazel, V., Busignies, V., Tchoreloff, P., 2015. Investigating the effect of tablet thickness and punch curvature on density distribution using finite elements method. *Int. J. Pharm.* 493, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.030>
- Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013. European pharmacopoeia, 8th ed.
- Djekic, L., Primorac, M., 2008. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int. J. Pharm.* 352, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.10.041>
- Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M., Krajisnik, D., 2004. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int. J. Pharm.* 271, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.037>
- Djordjevic, Primorac, M., Stupar, M., 2005. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. *Int. J. Pharm.* 296, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.02.014>
- Du, H., Feng, Q., Yang, X., Xu, R., Li, H., Dong, X., Zhu, Q., Wang, D., Lu, X., Niu, X., 2014. “Whole Chinese angelica” microemulsion: its preparation and in vivo and in vitro evaluations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40, 1330–1339. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.819881>
- Durmic, Z., Blache, D., 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Special Issue: Plant Bioactive Compounds in Ruminant Agriculture - Impacts and Opportunities 176, 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.018>
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E.H., Casabianca, H., Mousadik, A.E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* 483, 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- European Chemicals Agency (ECHA), 2017. Guidance on the Application of the CLP Criteria. Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures. Version 5.0 [WWW Document]. https://echa.europa.eu/documents/10162/23047722/clp_criteria_hh_revised_draft_guidance_rev_7_rac_forum_201305_en.pdf/fddb2d48-4007-47b3-9816-50d2b8ea33d0 (accessed 4.17.19).

- European Commision, 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone [WWW Document]. URL <http://www.wormwoodsociety.org/index.php/science-articles/european-commission-opinion-of-the-scientific-committee-on-food-on-thujone> (accessed 6.30.18).
- Fell, J.T., Newton, J.M., 1970. Determination of tablet strength by the diametral-compression test. *J. Pharm. Sci.* 59, 688–691. <https://doi.org/10.1002/jps.2600590523>
- Fernandes, C.P., Mascarenhas, M.P., Zibetti, F.M., Lima, B.G., Oliveira, R.P.R.F., Rocha, L., Falcão, D.Q., 2013. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Rev. Bras. Farmacogn.* 23, 108–114. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000127>
- Fernandez, P., André, V., Rieger, J., Kühnle, A., 2004. Nano-Emulsion Formation by Emulsion Phase Inversion. *ResearchGate* 251, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.09.029>
- Ferreira, J.F.S., 2009. *Artemisia* species in small ruminant production: their potential antioxidant and anthelmintic effects.
- Ferrero, C., Muñoz, N., Velasco, M.V., Muñoz-Ruiz, A., Jiménez-Castellanos, R., 1997. Disintegrating efficiency of croscarmellose sodium in a direct compression formulation. *Int. J. Pharm.* 147, 11–21. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04784-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04784-9)
- Flórez, J., 2008. Fármacos antiparasitarios: protozoos y helmintos, in: *Farmacología Humana*. pp. 1361–1390.
- Furtado, L.F.V., Bello, A.C.P.P., dos Santos, H.A., Carvalho, M.R.S., Rabelo, É.M.L., 2014. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. *Vet. Parasitol.* 206, 313–316. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.021>
- García, J.J., Bolás, F., Torrado, J.J., 2003. Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of albendazole. *Int. J. Pharm.* 250, 351–358.
- García Rodríguez, J.J.G., 2008. Estudio biofarmacéutico y parasitológico de una formulación de albendazol en hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid.
- García-Rodríguez, J.J., Andrés, M.F., Ibañez-Escribano, A., Julio, L.F., Burillo, J., Bolás-Fernández, F., González-Coloma, A., 2015. Selective nematocidal effects of essential oils from two cultivated *Artemisia absinthium* populations. *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.* 70, 275–280. <https://doi.org/10.1515/znc-2015-0109>
- Gattefosse, 2011a. Technical Data Sheet Lauroglycol 90.
- Gattefosse, 2011b. Technical Data Sheet Plurol Oleique CC497.
- Gattefosse, 2011c. Technical Data Sheet Labrasol.
- Geary, T.G., Blair, K., Ho, N.F., Sims, S.M., Thompson, D.P., 1995. Biological functions of nematode surfaces., in: *Molecular Approaches to Parasitology*.
- Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F.H., Thompson, D.P., 1993. Haemonchus contortus: Ivermectin-Induced Paralysis of the Pharynx. *Exp. Parasitol.* 77, 88–96. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1064>
- Gelbart, W.M., Gelbart, W., Ben-Shaul, A., Roux, D., 1994. Micelles, membranes, microemulsions, and monolayers. Springer-Verlag.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.* 139, 308–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>

- Golmohammadzadeh, S., Farhadian, N., Birihaee, A., Dehghani, F., Khameneh, B., 2017. Preparation, characterization and in vitro evaluation of microemulsion of raloxifene hydrochloride. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43, 1619–1625. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1328430>
- Gonzalez-Coloma, A., Bailen, M., Diaz, C.E., Fraga, B.M., Martínez-Díaz, R., Zuñiga, G.E., Contreras, R.A., Cabrera, R., Burillo, J., 2012. Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. *Ind. Crops Prod.* 37, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.025>
- Gottstein, B., Pozio, E., Nöckler, K., 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 127–145. <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-08>
- Gould, S.E., 1970. Trichinosis in man and animals. Thomas.
- Grace, 2015a. Evaluation of Porous and Non-Porous Solid Carriers for Lipid-Based Drug Delivery Systems.
- Grace, 2015b. Multifunctional Excipients for the Pharmaceutical Industry.
- Griffin, W.C., 1954. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Cosmet. Sci.* 5, 249–256.
- Griffin, W.C., 1949. Classification of surface-active agents by “HLB”. *J. Cosmet. Sci.* 1, 311–326.
- Gumaste, S.G., Dalrymple, D.M., Serajuddin, A.T.M., 2013a. Development of Solid SEDDS, V: Compaction and Drug Release Properties of Tablets Prepared by Adsorbing Lipid-Based Formulations onto Neusilin® US2. *Pharm. Res.* 30, 3186–3199. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1106-4>
- Gumaste, S.G., Pawlak, S.A., Dalrymple, D.M., Nider, C.J., Trombetta, L.D., Serajuddin, A.T.M., 2013b. Development of Solid SEDDS, IV: Effect of Adsorbed Lipid and Surfactant on Tableting Properties and Surface Structures of Different Silicates. *Pharm. Res.* 30, 3170–3185. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1114-4>
- Hamed, S.F., Sadek, Z., Edris, A., 2012. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clove Bud Essential Oil and Eugenol Nanoparticles in Alcohol-Free Microemulsion. *J. Oleo Sci.* 61, 641–648. <https://doi.org/10.5650/jos.61.641>
- Hansen, C.M., 1969. The Universality of the Solubility Parameter. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 8, 2–11. <https://doi.org/10.1021/i360029a002>
- Hansen, C.M., 1967. The three dimensional solubility parameter and solvent diffusion coefficient. Copenhagen Danish Technical Press.
- Hauss, D.J., 2007. Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. CRC Press.
- Haynes, W.M., Lide, D.R., Bruno, T.J., 2016. Handbook of Chemistry and Physics, 97th ed. CRC Press.
- Hentzschel, C.M., Sakmann, A., Leopold, C.S., 2011. Suitability of various excipients as carrier and coating materials for liquisolid compacts. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37, 1200–1207. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.564184>
- Hilden, J., Polizzi, M., Zettler, A., 2017. Note on the Use of Diametrical Compression to Determine Tablet Tensile Strength. *J. Pharm. Sci.* 106, 418–421. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.08.004>
- Ho, N.F.H., Geary, T.G., Barsuhn, C.L., Sims, S.M., Thompson, D.P., 1992. Mechanistic studies in the transcuticular delivery of antiparasitic drugs II: ex vivo/in vitro correlation of solute transport by *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 1–13. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90031-E](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90031-E)

- Holm, R., Jensen, I.H.M., Sonnergaard, J., 2006. Optimization of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) using a D-optimal design and the desirability function. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, 1025–1032. <https://doi.org/10.1080/03639040600559024>
- Hosseini, S.F., Zandi, M., Rezaei, M., Farahmandghavi, F., 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydr. Polym.* 95, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet. Parasitol.*, Special issue: Novel Approaches to the Control of Helminth Parasites of Livestock 186, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.042>
- Huang, Y.-B., Tsai, Y.-H., Yang, W.-C., Chang, J.-S., Wu, P.-C., Takayama, K., 2004. Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and in vitro/in vivo investigation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.037>
- Hüttemann, M., Schmah, G., Mehlhorn, H., 2007. Light and electron microscopic studies on two nematodes, *Angiostrongylus cantonensis* and *Trichuris muris*, differing in their mode of nutrition. *Parasitol. Res.* 101, 225–232. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0698-1>
- Iqbal, Z., Lateef, M., Ashraf, M., Jabbar, A., 2004. Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. *J. Ethnopharmacol.* 93, 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.046>
- Irum, S., Ahmed, H., Mukhtar, M., Mushtaq, M., Mirza, B., Donskow-Lysoniewska, K., Qayyum, M., Simsek, S., 2015. Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritima* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet. Parasitol.* 212, 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.028>
- ISO, 2013. Aromatic natural raw materials Vocabulary (ISO 9235:2013). [citado 8 de mayo de 2016]. Disponible en: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=51017 [WWW Document]. ISO. URL http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=51017 (accessed 5.8.16).
- Jarosz, P.J., Parrott, E.L., 1984. Effect of Lubricants on Tensile Strengths of Tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 10, 259–273. <https://doi.org/10.3109/03639048409064649>
- Jenkins, D.C., Erasmus, D.A., 1971. The ultrastructure of the intestine of *Ascaris suum* larvae. *Z. Parasitenkd. Berl. Ger.* 35, 173–187.
- Johnston, C., Guerrero, J., Chou, S., Hobday, M., Howe-Smith, R., Eisenberg, A., 2001. The Nematodes. Basic Nematode Life Cycle [WWW Document]. *Parasites Parasit. Dis. Domest. Anim.* URL <http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/index.html> (accessed 3.25.16).
- Julio, L.F., Burillo, J., Giménez, C., Cabrera, R., Díaz, C.E., Sanz, J., González-Coloma, A., 2015. Chemical and biocidal characterization of two cultivated *Artemisia absinthium* populations with different domestication levels. *Ind. Crops Prod.* 76, 787–792. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.041>
- Kachrimanis, K., Nikolakakis, I., Malamataris, S., 2003. Tensile strength and disintegration of tableted silicified microcrystalline cellulose: Influences of

- interparticle bonding. *J. Pharm. Sci.* 92, 1489–1501. <https://doi.org/10.1002/jps.10403>
- Khan, W.I., 2008. Physiological changes in the gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse-*Trichinella spiralis* model. *Parasitology* 135. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004381>
- Köhler, F.E. (Franz E., Gürke, M. (Max), Brandt, W., Pabst, G. (Gustav), Schellenberg, G. (Gustav), Vogtherr, M., 1883. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America / herausgegeben von G. Pabst. Gera-Untermhaus : Fr. Eugen Köhler,.
- Koocheki, A., Kadkhodae, R., 2011. Effect of Alyssum homolocarpum seed gum, Tween 80 and NaCl on droplets characteristics, flow properties and physical stability of ultrasonically prepared corn oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 25, 1149–1157. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.012>
- Kotze, A.C., Prichard, R.K., 2016. Chapter Nine - Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis, in: Gasser, R.B., Samson-Himmelstjerna, G.V. (Eds.), *Advances in Parasitology, And Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Academic Press, pp. 397–428. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>
- Kreilgaard, M., Pedersen, E.J., Jaroszewski, J.W., 2000. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J. Controlled Release* 69, 421–433. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00325-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00325-4)
- Kumar, R., Kumar, S., Sinha, V.R., 2016. Evaluation and Optimization of Water-in-Oil Microemulsion Using Ternary Phase Diagram and Central Composite Design. *J. Dispers. Sci. Technol.* 37, 166–172. <https://doi.org/10.1080/01932691.2015.1038351>
- Kutza, C., Metz, H., Kutza, J., Syrowatka, F., Mäder, K., 2013. Toward a detailed characterization of oil adsorbates as “solid liquids.” *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 84, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.12.008>
- Lacey, E., 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18, 885–936. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(88\)90175-0](https://doi.org/10.1016/0020-7519(88)90175-0)
- Lachenmeier, D.W., 2010. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.)--a curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? *J. Ethnopharmacol.* 131, 224–227. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.062>
- Lagues, M., Sauterey, C., 1980. Percolation transition in water in oil microemulsions. Electrical conductivity measurements. *J. Phys. Chem.* 84, 3503–3508. <https://doi.org/10.1021/j100463a003>
- Lamb, J., Elliott, T., Chambers, M., Chick, B., 2017. Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Vet. Parasitol.* 241, 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.008>
- Lanusse, C.E., Alvarez, L.I., Lifschitz, A.L., 2016. Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using *Haemonchus contortus* as a Model Nematode. *Adv. Parasitol.* 93, 465–518. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.014>
- Lawrence, M.J., Rees, G.D., 2012. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF

- ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL 64, Supplement, 175–193. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.018>
- Lawrence, M.J., Rees, G.D., 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Emulsions for Drug Delivery 45, 89–121. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00103-4)
- Lee, D.L., 2002. General organization, in: *The Biology of Nematodes*. CRC Press, Nueva York, pp. 59–140.
- Lee, J.-J., Park, J.-H., Lee, J.-Y., Jeong, J.Y., Lee, S.Y., Yoon, I.-S., Kang, W.-S., Kim, D.-D., Cho, H.-J., 2016. Omega-3 fatty acids incorporated colloidal systems for the delivery of *Angelica gigas* Nakai extract. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 140, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.047>
- Lewis, G.A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R., 1998. *Pharmaceutical Experimental Design*. CRC Press.
- Limnell, T., 2011. Mesoporous silica- and silicon-based materials as carriers for poorly water soluble drugs.
- Lin, S., Wang, S., Hu, X., Chen, D., Tong, C., Li, S., 2010. [Epidemiology of soil-transmitted nematode infections in central mountain area of Hainan province]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 28, 160–161.
- Lin, Tsai, M.-J., Fang, Y.-P., Fu, Y.-S., Huang, Y.-B., Wu, P.-C., 2017. Microemulsion formulation design and evaluation for hydrophobic compound: catechin topical application. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 161, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.015>
- Lindsey, J.K., 1972. Fitting Response Surfaces with Power Transformations. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* 21, 234–247. <https://doi.org/10.2307/2346274>
- Lopes, L.B., 2014. Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions. *Pharmaceutics* 6, 52–77. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6010052>
- Macchioni, F., Segundo, H., Gabrielli, S., Totino, V., Gonzales, P.R., Salazar, E., Bozo, R., Bartoloni, A., Cancrini, G., 2015. Dramatic Decrease in Prevalence of Soil-Transmitted Helminths and New Insights Into Intestinal Protozoa in Children Living in the Chaco Region, Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 794–796. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0039>
- Madhav, K.V., Kishan, V., 2017. Self microemulsifying particles of loratadine for improved oral bioavailability: preparation, characterization and in vivo evaluation. *J. Pharm. Investig.* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0344-6>
- Maestro, A., Solè, I., González, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M., 2008. Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *J. Colloid Interface Sci.* 327, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.07.059>
- Malakar, J., Nayak, A.K., Goswami, S., 2012. Use of Response Surface Methodology in the Formulation and Optimization of Bisoprolol Fumarate Matrix Tablets for Sustained Drug Release. *ISRN Pharm.* 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/730624>
- Maltais, M., Vargas, R., DiPaolo, T., 2015. Development of a new formulation for direct compression of a natural product. *J. Pharm. Technol. Drug Res.* 4, 2. <https://doi.org/10.7243/2050-120X-4-2>
- Malvern. Zetasizer Nano series. User manual, 2013.
- Mangal, S., Meiser, F., Morton, D., Larson, I., 2015. Particle Engineering of Excipients for Direct Compression: Understanding the Role of Material Properties. *Curr. Drug Metab.* 21, 5877–5889.

- Martín, L., Mainar, A.M., González-Coloma, A., Burillo, J., Urieta, J.S., 2011. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *J. Supercrit. Fluids* 56, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.11.017>
- Martinello, T., Kaneko, T.M., Velasco, M.V.R., Taqueda, M.E.S., Consiglieri, V.O., 2006. Optimization of poorly compactable drug tablets manufactured by direct compression using the mixture experimental design. *Int. J. Pharm.* 322, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.034>
- Martínez Carmona, M., 2016. Nanomateriales de sílice mesoestructurada: aplicación en infección y cáncer. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Martínez-Díaz, R.A., Ibáñez-Escribano, A., Burillo, J., de las Heras, L., del Prado, G., Agulló-Ortuño, M.T., Julio, L.F., González-Coloma, A., 2015. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 693–699. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140129>
- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M., 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J. Phys. Condens. Matter* 18, R635. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>
- Mattsson, S., Nyström, C., 2001. Evaluation of critical binder properties affecting the compactibility of binary mixtures. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 181–194.
- McClements, D.J., 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8, 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>
- Mehlhorn, H., 2008. Encyclopedia of Parasitology.
- Mehta, S.K., Bala, K., 2000. Tween-based microemulsions: a percolation view. *Fluid Phase Equilibria* 172, 197–209. [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(00\)00378-2](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(00)00378-2)
- Mejia Torres, R.E., Franco Garcia, D.N., Fontecha Sandoval, G.A., Hernandez Santana, A., Singh, P., Mancero Bucheli, S.T., Saboya, M., Paz, M.Y., 2014. Prevalence and Intensity of Soil-Transmitted Helminthiasis, Prevalence of Malaria and Nutritional Status of School Going Children in Honduras. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3248. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003248>
- Mirani, A.G., Patankar, S.P., Borole, V.S., Pawar, A.S., Kadam, V.J., 2011. Direct Compression High Functionality Excipient Using Coprocessing Technique: A Brief Review. *Curr. Drug Deliv.* 8, 426–435. <https://doi.org/10.2174/156720111795767960>
- Mitreva, M., 2006. Biology and genome of *Trichinella spiralis*. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.124.1>
- Mohamad Zen, N.I., Abd Gani, S.S., Shamsudin, R., Fard Masoumi, H.R., 2015. The Use of D-Optimal Mixture Design in Optimizing Development of Okara Tablet Formulation as a Dietary Supplement. *Sci. World J.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/684319>
- Monteagudo, E., Langenheim, M., Salerno, C., Buontempo, F., Bregni, C., Carlucci, A., 2014. Pharmaceutical optimization of lipid-based dosage forms for the improvement of taste-masking, chemical stability and solubilizing capacity of phenobarbital. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40, 783–792. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.787536>
- Moser, W., Schindler, C., Keiser, J., 2017. Efficacy of recommended drugs against soil transmitted helminths: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* j4307. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4307>

- Mottier, L., Alvarez, L., Ceballos, L., Lanusse, C., 2006. Drug transport mechanisms in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Exp. Parasitol.* 113, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.12.004>
- Muller, R., Wakelin, D., 2002. The Nematodes, in: *Worms and Human Disease*. Cabi, pp. 109–239.
- Murrell, K.D., Pozio, E., 2011. Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2194–2202. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110896>
- Muzaffar, F., Singh, U.K., Chauhan, L., 2013. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, 39–53.
- Muzíková, J., 2002. [Effect of magnesium stearate on the tensile strength of tablets made with the binder Prosolv SMCC 90]. *Ceska Slov. Farm. Cas. Ceske Farm. Spolecnosti Slov. Farm. Spolecnosti* 51, 41–43.
- Muzíková, J., Louzenska, M., Pekarek, T., 2016. A study of compression process and properties of tablets with microcrystalline cellulose and colloidal silicon dioxide. *Acta Polinae Pharm.* 73, 1259–1265.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2016. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, Fourth edition. ed, Wiley series in probability and statistics. Wiley, Hoboken, New Jersey.
- Naoui, W., Bolzinger, M.-A., Fenet, B., Pelletier, J., Valour, J.-P., Kalfat, R., Chevalier, Y., 2011. Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. *Pharm. Res.* 28, 1683–1695. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0404-y>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2019a. 2-Hydroxypropyl laurate, CID=14870, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Hydroxypropyl-laurate> (accessed on Aug. 26, 2019) [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14870> (accessed 8.26.19).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2019b. Decaglyceryl monooleate, CID=9963243, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Decaglyceryl-monooleate> (accessed on Aug. 26, 2019) [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9963243> (accessed 8.26.19).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2019c. Propylene glycol, CID=1030, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylene-glycol> (accessed on Aug. 26, 2019) [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1030> (accessed 8.26.19).
- Nazar, M.F., Khan, A.M., Shah, S.S., 2009. Microemulsion system with improved loading of piroxicam: a study of microstructure. *AAPS PharmSciTech* 10, 1286–1294. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9328-9>
- Nielloud, F., Marti-Mestres, G., 2010. *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, 2nd ed, Drugs and the pharmaceutical sciences. Informa Healthcare, Londres.
- NIST, 2016. Chemistry WebBook. [citado 21 de agosto de 2016]. Disponible en: <http://webbook.nist.gov/>.
- NIST/SEMATECH, 2012. *Handbook of Statistical Methods*.
- Noeckler, K., Pozio, E., van der Giessen, J., Hill, D.E., Gamble, H.R., 2019. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of *Trichinella* in food animals. *Food Waterborne Parasitol.* 14, e00041. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00041>

- Okonogi, S., Chaiyana, W., 2012. Enhancement of anti-cholinesterase activity of *Zingiber cassumunar* essential oil using a microemulsion technique. *Drug Discov. Ther.* <https://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.5.249>
- OMS, 2017. Model Lists of Essential Medicines [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/> (accessed 10.30.17).
- OMS, 2016. Soil-transmitted helminth infections. Fact sheet. [citado 24 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/>.
- OMS, 2012. Deworming to combat the health and nutritional impact of soil-transmitted helminths. Biological, behavioural and contextual rationale. [citado 24 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/elena/titles/bbc/deworming/en/>.
- Orafidiya, L.O., Oladimeji, F.A., 2002. Determination of the required HLB values of some essential oils. *Int. J. Pharm.* 237, 241–249. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00051-0)
- Ortega-Pierres, G., Vaquero-Vera, A., Fonseca-Liñán, R., Bermúdez-Cruz, R.M., Argüello-García, R., 2015. Induction of protection in murine experimental models against *Trichinella spiralis*: an up-to-date review. *J. Helminthol.* 89, 526–539. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000140>
- Palmeirim, M.S., Hürlimann, E., Knopp, S., Speich, B., Jr, V.B., Joseph, S.A., Vaillant, M., Oliaro, P., Keiser, J., 2018. Efficacy and safety of co-administered ivermectin plus albendazole for treating soil-transmitted helminths: A systematic review, meta-analysis and individual patient data analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006458. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006458>
- Pappas, P.W., 1988. The relative roles of the intestines and external surfaces in the nutrition of monogeneans, digeneans and nematodes. *Parasitology* 96, S105–S121.
- Paredes, A.J., Bruni, S.S., Allemandi, D., Lanusse, C., Palma, S.D., 2018. Albendazole nanocrystals with improved pharmacokinetic performance in mice. *Ther. Deliv.* 9, 89–97. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0090>
- Parthasarathi, S., Muthukumar, S.P., Anandharamakrishnan, C., 2016. The influence of droplet size on the stability, in vivo digestion, and oral bioavailability of vitamin E emulsions. *Food Funct.* 7, 2294–2302. <https://doi.org/10.1039/C5FO01517K>
- Peng, C., Svirskis, D., Lee, S.J., Oey, I., Kwak, H.-S., Chen, G., Bunt, C., Wen, J., 2017. Design of microemulsion system suitable for the oral delivery of poorly aqueous soluble beta-carotene. *Pharm. Dev. Technol.* 1–7. <https://doi.org/10.1080/10837450.2017.1287729>
- Peyrelasse, J., Moha-Ouchane, M., Boned, C., 1988. Viscosity and the phenomenon of percolation in microemulsions. *Phys. Rev. A* 38, 4155–4161. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.4155>
- Pingali, K., Mendez, R., Lewis, D., Michniak-Kohn, B., Cuitino, A., Muzzio, F., 2011. Mixing order of glidant and lubricant – Influence on powder and tablet properties. *Int. J. Pharm.* 409, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.032>
- Pouton, C.W., Porter, C.J.H., 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 625–637. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.010>
- Preston, S., Gasser, R.B., 2018. Working towards New Drugs against Parasitic Worms in a Public-Development Partnership. *Trends Parasitol.* 34, 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.005>
- Prince, L.M., 1977. Schulman's microemulsions, in: *Microemulsions: Theory and Practice*. Academic Press, Nueva York, pp. 1–20.

- Prince, L.M., 1967. A theory of aqueous emulsions I. Negative interfacial tension at the oil/water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 23, 165–173. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(67\)90099-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(67)90099-9)
- Pullan, R.L., Smith, J.L., Jasrasaria, R., Brooker, S.J., 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit. Vectors* 7, 37. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-37>
- Quiroz Romero, H., 1999. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Editorial Limusa.
- Rabiee, H., Seyed Shahabadi, S.M., Mokhtare, A., Rabiei, H., Alvandifar, N., 2016. Enhancement in permeation and antifouling properties of PVC ultrafiltration membranes with addition of hydrophilic surfactant additives: Tween-20 and Tween-80. *J. Environ. Chem. Eng.* 4. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.09.015>
- Rakshit, S., Moulik, S.Priya., 2008. *Physicochemistry of W/O Microemulsions: Formation, Stability and Droplet Clustering*, in: *Microemulsion Systems and Their Potential as Drug Carriers*. CRC Press.
- Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2014. Anthelmintic drugs, in: *Rang & Dale's Pharmacology: With STUDENT CONSULT Online Access*. Elsevier Health Sciences, pp. 671–675.
- Rao, J., McClements, D.J., 2011. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5026–5035. <https://doi.org/10.1021/jf200094m>
- Reliasoft, 2015. *Experiment Design and Analysis Reference*.
- Robbins, M.L., 1977. Theory for the Phase Behavior of Microemulsions, in: *Micellization, Solubilization, and Microemulsions*. Springer, Boston, MA, pp. 713–754. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4157-4_14
- Rojas, J.J., Aristizabal, J., Henao, M., 2013. Screening of several excipients for direct compression of tablets: A new perspective based on functional properties. *Rev. Ciênc. Farm. Básica E Apl.* 34, 17–23.
- Romero-Benavides, J.C., Ruano, A.L., Silva-Rivas, R., Castillo-Veintimilla, P., Vivanco-Jaramillo, S., Bailon-Moscoso, N., 2017. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *Eur. J. Med. Chem.* 129, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.005>
- Romsted, L.S., Win, M., Lang, P., Vashishtha, M., Shah, D.O., 2014. Pharmaceutical Microemulsions and Drug Delivery, in: *Surfactant Science and Technology: Retrospects and Prospects*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 377–397.
- Rondanini, D.P., Castro, D.N., Searles, P.S., Rousseaux, M.C., 2011. Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of Northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas Aceites* 62, 399–409.
- Rosano, H.L., Clausse, M., 1987. *Microemulsion Systems*. CRC Press.
- Rostami, A., Riahi, S.M., Ghadimi, R., Hanifehpour, H., Hamidi, F., Khazan, H., Ray Gamble, H., 2018. A systematic review and meta-analysis on the global seroprevalence of *Trichinella* infection among wild boars. *Food Control* 91, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.028>
- Rowe, R.C., 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed. Pharmaceutical Press, London.
- Ruckenstein, E., Chi, J.C., 1975. Stability of microemulsions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 71, 1690. <https://doi.org/10.1039/f29757101690>
- Sadeghpour Galooyak, S., Dabir, B., 2015. Three-factor response surface optimization of nano-emulsion formation using a microfluidizer. *J. Food Sci. Technol.* 52, 2558–2571. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1363-1>

- Sager, H., Hosking, B., Bapst, B., Stein, P., Vanhoff, K., Kaminsky, R., 2009. Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 159, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.006>
- Saha, R., Rakshit, S., Mitra, R.K., Pal, S.K., 2012. Microstructure, morphology, and ultrafast dynamics of a novel edible microemulsion. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 28, 8309–8317. <https://doi.org/10.1021/la3012124>
- Said, M., Elsayed, I., Aboelwafa, A.A., Elshafeey, A.H., 2017. Transdermal agomelatine microemulsion gel: pyramidal screening, statistical optimization and *in vivo* bioavailability. *Drug Deliv.* 24, 1159–1169. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1365392>
- Sainz, P., Cruz-Estrada, Á., Díaz, C.E., González-Coloma, A., 2017. The genus *Artemisia*: distribution and phytochemistry in the Iberian Peninsula and the Canary and Balearic Islands. *Phytochem. Rev.* 16, 1023–1043. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9516-2>
- Sakia, R.M., 1992. The Box-Cox Transformation Technique: A Review. *J. R. Stat. Soc. Ser. Stat.* 41, 169–178. <https://doi.org/10.2307/2348250>
- Salimi, A., Motaharitarab, E., Goudarzi, M., Rezaie, A., Kalantari, H., 2014. Toxicity evaluation of microemulsion (nano size) of sour cherry kernel extract for the oral bioavailability enhancement. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 9, 16–23.
- Sawatdee, S., Atipairin, A., Sae Yoon, A., Srichana, T., Changsan, N., Suwandecha, T., 2019. Formulation Development of Albendazole-Loaded Self-Microemulsifying Chewable Tablets to Enhance Dissolution and Bioavailability. *Pharmaceutics* 11, 134. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030134>
- Schmitz, K.S., Phillies, G.D.J., 1991. An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules. *Phys. Today* 44, 66–66. <https://doi.org/10.1063/1.2810116>
- Schulman, J.H., Montagne, J.B., 1961. Formation of microemulsions by amino alkyl alcohols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 92, 366–371. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1961.tb44987.x>
- Schwenkenbecher, J.M., Albonico, M., Bickle, Q., Kaplan, R.M., 2007. Characterization of beta-tubulin genes in hookworms and investigation of resistance-associated mutations using real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.019>
- Shakeel, F., Haq, N., Alanazi, F.K., Alsarra, I.A., 2014. Self-nanoemulsifying performance of two grades of Lauroglycol (Lauroglycol-90 and Lauroglycol-FCC) in the presence of mixed nonionic surfactants. *Pharm. Dev. Technol.* 19, 799–805. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.829099>
- Shao, H., Xi, N., Zhang, Y., 2018. Microemulsion formulation of a new biopesticide to control the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Sci. Rep.* 8, 10565. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28626-0>
- Sheikh-salem, M., Alkaysi, H., Fell, J.T., 1988. The Tensile Strength of Tablets of Binary Mixtures Lubricated with Magnesium Stearate. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14, 895–903. <https://doi.org/10.3109/03639048809151909>
- Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., Greige-Gerges, H., 2013. Essential oils encapsulated in liposomes: A review. *J. Liposome Res.* 23. <https://doi.org/10.3109/08982104.2013.819888>
- Shibata, N., Ohno, T., Shimokawa, T., Hu, Z., Yoshikawa, Y., Koga, K., Murakami, M., Takada, K., 2001. Application of pressure-controlled colon delivery capsule to oral administration of glycyrrhizin in dogs. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 441–447. <https://doi.org/10.1211/0022357011775730>

- Shinoda, K., 1969. The comparison between the PIT system and the HLB-value system to emulsifier selection. Presented at the Proceedings of the 5 th International Congress of Surface Activity, Barcelona (España), pp. 275–283.
- Shinoda, K., Kunieda, H., 1973. Conditions to produce so-called microemulsions: Factors to increase the mutual solubility of oil and water by solubilizer. *J. Colloid Interface Sci.* 42, 381–387. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(73\)90303-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(73)90303-2)
- Sigma-Aldrich. Polysorbate 80 59924, 2019.
- Sims, S.M., Ho, N.F., Geary, T.G., Thomas, E.M., Day, J.S., Barsuhn, C.L., Thompson, D.P., 1996. Influence of organic acid excretion on cuticle pH and drug absorption by *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 26, 25–35.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2007. Principles of instrumental analysis, 6 ed., internat. student ed. ed. Thomson Brooks/Cole, Belmont, Calif.
- Stewart, G., Despommier, D.D., Burnham, J., Raines, K.M., 1987. *Trichinella spiralis*: behaviour, structure and biochemistry of larvae following exposure to components of the host enteric environment. *Exp. Parasitol.* 63, 195–204.
- Strunz, E.C., Addiss, D.G., Stocks, M.E., Ogden, S., Utzinger, J., Freeman, M.C., 2014. Water, sanitation, hygiene, and soil-transmitted helminth infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 11, e1001620. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001620>
- Stubenrauch, C., Patravale, V.B., Date, A.A., 2008. Microemulsions: Pharmaceutical Applications, in: *Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives*. Wiley, pp. 259–301.
- Subcommittee on Characterization of Porous Solids, 1994. Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure Appl Chem* 66, 1739–1758.
- Subongkot, T., Ngawhirunpat, T., 2017. Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid. *Int. J. Nanomedicine Volume* 12, 5585–5599. <https://doi.org/10.2147/IJN.S142503>
- Sun-Kou, M. del R., Carrasco, V., R, E., Escobar, P., I, G., 2013. Oxidación catalítica de albendazol empleando como catalizador molibdeno soportado en nanotubos de carbono. *Rev. Soc. Quím. Perú* 79, 291–303.
- Swarbrick, J., 2007. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare.
- Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S., 2009. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Vet. Parasitol.* 160, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.084>
- Thompson, D.P., Geary, T.G., 2003. Helminth surfaces: structural, molecular and functional properties., in: *Molecular Medical Parasitology*. Academic Press, Gran Bretaña, pp. 297–338.
- Tibalinda, P., Sempombe, J., Shedafa, R., Masota, N., Pius, D., Temu, M., Kaale, E., 2016. Formulation development and optimization of Lamivudine 300 mg and Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) 300 mg FDC tablets by D-optimal mixture design. *Heliyon* 2, e00207. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00207>
- Turek, C., Stintzing, F.C., 2013. Stability of Essential Oils: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Tye, C.K., Sun, C.C., Amidon, G.E., 2005. Evaluation of the effects of tableting speed on the relationships between compaction pressure, tablet tensile strength, and tablet solid fraction. *J. Pharm. Sci.* 94, 465–472. <https://doi.org/10.1002/jps.20262>
- Valicherla, G.R., Dave, K.M., Syed, A.A., Riyazuddin, M., Gupta, A.P., Singh, A., Wahajuddin, Mitra, K., Datta, D., Gayen, J.R., 2016. Formulation optimization of Docetaxel loaded self-emulsifying drug delivery system to enhance

- bioavailability and anti-tumor activity. *Sci. Rep.* 6, 26895. <https://doi.org/10.1038/srep26895>
- Vialpando, M., Aerts, A., Persoons, J., Martens, J., Mooter, G.V.D., 2011. Evaluation of ordered mesoporous silica as a carrier for poorly soluble drugs: Influence of pressure on the structure and drug release. *J. Pharm. Sci.* 100, 3411–3420. <https://doi.org/10.1002/jps.22535>
- Vialpando, M., Backhuijs, F., Martens, J.A., Van den Mooter, G., 2012. Risk assessment of premature drug release during wet granulation of ordered mesoporous silica loaded with poorly soluble compounds itraconazole, fenofibrate, naproxen, and ibuprofen. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV 81*, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.01.012>
- Vokřál, I., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Skálová, L., 2013. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 196, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.018>
- Wakelin, D., Lloyd, M., 1976. Immunity to primary and challenge infections of *Trichinella spiralis* in mice: a re-examination of conventional parameters. *Parasitology* 72, 173–182.
- Wang, 2014. Preparation of nano- and microemulsions using phase inversion and emulsion titration methods: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Food Technology at Massey University, Auckland, New Zealand (Thesis). Massey University.
- Wang, X., Wang, Y.-W., Huang, Q., 2009. Enhancing Stability and Oral Bioavailability of Polyphenols Using Nanoemulsions, in: *Micro/Nanoencapsulation of Active Food Ingredients*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 198–212. <https://doi.org/10.1021/bk-2009-1007.ch013>
- Wang, Z., Pal, R., 2016. Microemulsion and their applications in drug delivery, in: *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, Fourth Edition. CRC Press.
- Wang, Z., Sun, J., Wang, Y., Liu, X., Liu, Y., Fu, Q., Meng, P., He, Z., 2010. Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: Preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 383, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.014>
- Wink, M., 2012. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Mol. Basel Switz.* 17, 12771–12791. <https://doi.org/10.3390/molecules171112771>
- Winsor, P.A., 1948. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. *Trans. Faraday Soc.* 44, 376–398. <https://doi.org/10.1039/TF9484400376>
- Wright, C.W., 2002. *Artemisia absinthium*, in: *Artemisia*. Taylor & Francis, Londres, pp. 79–90.
- Xavier-Junior, F.H., Vauthier, C., Morais, A.R.V., Alencar, E.N., Egito, E.S.T., 2017. Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43, 700–714. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1235186>
- Yang, V.W., 2012. Chapter 15 - The Cell Cycle, in: Johnson, L.R., Ghishan, F.K., Kaunitz, J.D., Merchant, J.L., Said, H.M., Wood, J.D. (Eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Fifth Edition). Academic Press, Boston, pp. 451–471. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382026-6.00015-4>
- Yuan, Y., Che, X., Zhao, M., Wang, Y., Liu, Y., Schwendeman, A., Li, S., 2015. Development of cyclosporine A microemulsion for parenteral delivery. *J. Microencapsul.* 32, 273–280. <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1010461>

- Zargar-Shoshtari, S., Wen, J., Alany, R.G., 2010. Formulation and physicochemical characterization of imwitor 308 based self microemulsifying drug delivery systems. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 58, 1332–1338. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1332>
- Zhang, J., Peng, Q., Shi, S., Zhang, Q., Sun, X., Gong, T., Zhang, Z., 2011. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) loaded with morin-phospholipid complex. *Int. J. Nanomedicine* 6, 3405–3414. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25824>
- Zhu, L., Dai, J.L., Yang, L., Qiu, J., 2013. In vitro ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Vet. Parasitol.* 195, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.050>
- Ziegelbauer, K., Speich, B., Mäusezahl, D., Bos, R., Keiser, J., Utzinger, J., 2012. Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 9, e1001162. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001162>

ANEXO

7. ANEXO

Tabla 7.1. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween® 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 30 °C.

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (0% p/p)					Agua (10% p/p)					Agua (20% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,11	0,11	0,11	0,11	0,0017	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0026	0,17	0,16	0,16	0,16	0,0078
1,17	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0024	0,15	0,15	0,16	0,15	0,0066	0,20	0,19	0,19	0,19	0,0075
1,37	0,15	0,15	0,15	0,15	0,0040	0,18	0,18	0,18	0,18	0,0013	0,23	0,22	0,22	0,22	0,0086
1,60	0,18	0,17	0,17	0,17	0,0040	0,21	0,21	0,21	0,21	-	0,27	0,26	0,26	0,26	0,0066
1,88	0,21	0,20	0,20	0,20	0,0035	0,24	0,24	0,24	0,24	0,0007	0,31	0,30	0,30	0,30	0,0082
2,20	0,24	0,23	0,24	0,24	0,0049	0,28	0,28	0,29	0,28	0,0056	0,37	0,35	0,35	0,36	0,0086
2,58	0,28	0,28	0,27	0,28	0,0058	0,33	0,33	0,33	0,33	0,0007	0,43	0,41	0,41	0,42	0,0101
3,02	0,33	0,32	0,32	0,32	0,0033	0,39	0,38	0,38	0,39	0,0026	0,50	0,48	0,48	0,49	0,0108
3,53	0,39	0,38	0,38	0,38	0,0057	0,45	0,45	0,45	0,45	0,0007	0,58	0,57	0,56	0,57	0,0103
4,13	0,45	0,44	0,44	0,44	0,0062	0,53	0,53	0,52	0,53	0,0066	0,68	0,66	0,66	0,67	0,0125
4,84	0,53	0,52	0,52	0,52	0,0062	0,62	0,62	0,62	0,62	0,0026	0,79	0,78	0,77	0,78	0,0135
5,67	0,61	0,61	0,60	0,61	0,0064	0,73	0,72	0,72	0,72	0,0020	0,93	0,91	0,90	0,91	0,0135
6,63	0,72	0,71	0,71	0,71	0,0077	0,85	0,85	0,85	0,85	0,0020	1,08	1,06	1,06	1,07	0,0131
7,77	0,84	0,83	0,83	0,83	0,0083	1,00	0,99	1,00	1,00	0,0045	1,27	1,24	1,24	1,25	0,0196
9,09	0,98	0,97	0,97	0,97	0,0088	1,17	1,16	1,16	1,16	0,0065	1,48	1,45	1,45	1,46	0,0196
10,60	1,15	1,14	1,13	1,14	0,0113	1,36	1,36	1,36	1,36	-	1,73	1,70	1,70	1,71	0,0196
12,50	1,35	1,33	1,33	1,34	0,0131	1,60	1,59	1,59	1,59	0,0065	2,02	1,99	1,99	2,00	0,0196
14,60	1,57	1,56	1,56	1,56	0,0065	1,87	1,86	1,86	1,86	0,0065	2,37	2,33	2,33	2,34	0,0261
17,10	1,84	1,82	1,82	1,83	0,0131	2,19	2,18	2,18	2,18	0,0065	2,77	2,73	2,72	2,74	0,0299
20,00	2,15	2,13	2,13	2,14	0,0131	2,56	2,56	2,57	2,56	0,0065	3,24	3,20	3,19	3,21	0,0299
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0054	0,0018	0,0000	-	-	0,0021	0,0013	0,0011	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,1074	0,1065	0,1065	0,1068	0,0006	0,1280	0,1277	0,1278	0,1279	0,0002	0,9999	0,9999	0,9999	0,1602	0,0013
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Coefficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (40% p/p)					Agua (50% p/p)					Agua (60% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,34	0,25	0,25	0,28	0,0549	0,22	0,21	0,21	0,21	0,22	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0017
1,17	0,36	0,30	0,29	0,32	0,0414	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12	0,12	0,0006
1,37	0,40	0,36	0,34	0,37	0,0314	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0023
1,60	0,45	0,42	0,40	0,42	0,0289	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,15	0,15	0,14	0,15	0,0062
1,88	0,52	0,48	0,46	0,48	0,0314	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,17	0,17	0,16	0,17	0,0040
2,20	0,59	0,55	0,53	0,56	0,0330	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,19	0,19	0,19	0,19	0,0011
2,58	0,67	0,63	0,61	0,64	0,0357	0,54	0,55	0,54	0,54	0,54	0,22	0,22	0,23	0,22	0,0051
3,02	0,77	0,73	0,71	0,74	0,0388	0,63	0,64	0,64	0,64	0,63	0,25	0,26	0,27	0,26	0,0085
3,53	0,89	0,84	0,82	0,85	0,0398	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,29	0,30	0,30	0,30	0,0079
4,13	1,02	0,97	0,94	0,98	0,0441	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,33	0,34	0,35	0,34	0,0108
4,84	1,17	1,12	1,09	1,13	0,0457	1,00	1,01	1,01	1,01	1,00	0,38	0,40	0,41	0,40	0,0136
5,67	1,34	1,29	1,26	1,30	0,0457	1,17	1,18	1,18	1,18	1,17	0,45	0,46	0,47	0,46	0,0153
6,63	1,54	1,49	1,46	1,50	0,0457	1,37	1,38	1,38	1,38	1,37	0,52	0,53	0,55	0,53	0,0187
7,77	1,78	1,72	1,69	1,73	0,0519	1,60	1,61	1,61	1,61	1,60	0,60	0,62	0,64	0,62	0,0221
9,09	2,05	1,99	1,96	2,00	0,0519	1,87	1,88	1,88	1,88	1,87	0,69	0,72	0,74	0,72	0,0283
10,60	2,37	2,30	2,27	2,31	0,0581	2,19	2,19	2,19	2,19	2,19	0,80	0,83	0,86	0,83	0,0345
12,50	2,73	2,67	2,63	2,68	0,0570	2,55	2,55	2,55	2,55	2,55	0,93	0,96	1,00	0,96	0,0413
14,60	3,16	3,10	3,04	3,10	0,0679	2,98	2,99	2,99	2,99	2,98	1,08	1,12	1,16	1,12	0,0453
17,10	3,65	3,58	3,54	3,59	0,0630	3,49	3,50	3,50	3,50	3,49	1,25	1,30	1,35	1,30	0,0566
20,00	4,23	4,16	4,10	4,16	0,0736	4,08	4,06	4,07	4,07	4,08	1,45	1,51	1,57	1,51	0,0679
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,1466	0,1015	0,0895	-	-	0,0019	0,0219	0,2031	-	-	0,0376	0,0274	0,0325	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,2063	0,2050	0,2027	0,2047	0,0021	0,2032	0,2031	0,2031	0,2031	4,1·10 ⁻⁵	0,0711	0,0744	0,0776	0,0744	0,0037
Coefficiente de correlación	0,9998	0,9997	0,9998	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9996	0,9995	0,9996	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Tabla 7.2. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween® 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 37 °C.

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (0% p/p)					Agua (10% p/p)					Agua (20% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,08	0,08	0,07	0,08	0,0017	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0023	0,12	0,11	0,11	0,11	0,0039
1,17	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0027	0,11	0,11	0,11	0,11	0,0026	0,14	0,13	0,13	0,13	0,0043
1,37	0,11	0,10	0,10	0,10	0,0035	0,13	0,12	0,12	0,13	0,0039	0,16	0,15	0,15	0,15	0,0058
1,60	0,12	0,12	0,12	0,12	0,0030	0,15	0,15	0,14	0,15	0,0041	0,19	0,18	0,17	0,18	0,0069
1,88	0,14	0,14	0,14	0,14	0,0017	0,18	0,17	0,17	0,17	0,0036	0,22	0,21	0,21	0,21	0,0062
2,20	0,17	0,16	0,16	0,17	0,0049	0,20	0,20	0,20	0,20	0,0030	0,25	0,24	0,24	0,24	0,0056
2,58	0,20	0,19	0,19	0,19	0,0033	0,24	0,23	0,23	0,23	0,0053	0,29	0,28	0,28	0,29	0,0075
3,02	0,23	0,23	0,23	0,23	0,0036	0,28	0,27	0,27	0,27	0,0052	0,34	0,33	0,33	0,34	0,0078
3,53	0,27	0,27	0,26	0,27	0,0046	0,33	0,32	0,32	0,32	0,0069	0,40	0,39	0,39	0,39	0,0096
4,13	0,32	0,31	0,31	0,31	0,0056	0,38	0,37	0,37	0,37	0,0052	0,47	0,45	0,45	0,46	0,0095
4,84	0,37	0,36	0,36	0,36	0,0036	0,44	0,44	0,43	0,44	0,0058	0,55	0,53	0,53	0,54	0,0101
5,67	0,43	0,43	0,42	0,43	0,0041	0,52	0,51	0,51	0,51	0,0073	0,64	0,62	0,62	0,63	0,0109
6,63	0,50	0,50	0,50	0,50	0,0046	0,61	0,60	0,59	0,60	0,0082	0,75	0,73	0,73	0,74	0,0118
7,77	0,59	0,58	0,58	0,58	0,0056	0,71	0,70	0,70	0,70	0,0092	0,87	0,86	0,85	0,86	0,0135
9,09	0,69	0,68	0,68	0,68	0,0062	0,83	0,82	0,82	0,82	0,0086	1,02	1,00	1,00	1,01	0,0141
10,60	0,81	0,80	0,80	0,80	0,0062	0,97	0,96	0,95	0,96	0,0099	1,19	1,17	1,17	1,18	0,0131
12,50	0,94	0,93	0,93	0,94	0,0075	1,13	1,12	1,12	1,12	0,0065	1,39	1,37	1,37	1,38	0,0131
14,60	1,10	1,09	1,09	1,09	0,0065	1,33	1,31	1,31	1,32	0,0131	1,63	1,60	1,60	1,61	0,0196
17,10	1,29	1,28	1,28	1,28	0,0065	1,55	1,54	1,53	1,54	0,0113	1,91	1,88	1,87	1,89	0,0236
20,00	1,51	1,50	1,49	1,50	0,0113	1,82	1,80	1,79	1,80	0,0173	2,23	2,20	2,19	2,21	0,0236
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0037	-9,3·10 ⁻⁵	-7,2·10 ⁻⁵	-	-	0,0051	0,0007	0,0005	-	-	0,0074	0,0004	0,0005	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0753	0,0748	0,0747	0,0749	0,0003	0,0906	0,0899	0,0896	0,0900	0,0006	0,1112	0,1099	0,1096	0,1102	0,0010
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (40% p/p)					Agua (50% p/p)					Agua (60% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,17	0,15	0,16	0,16	0,0091	0,14	0,15	0,14	0,14	0,0057	0,12	0,12	0,12	0,12	-
1,17	0,19	0,18	0,19	0,19	0,0043	0,16	0,17	0,17	0,17	0,0051	0,13	0,14	0,13	0,13	0,0051
1,37	0,22	0,21	0,22	0,22	0,0063	0,19	0,20	0,20	0,20	0,0062	0,15	0,16	0,15	0,15	0,0079
1,60	0,26	0,25	0,25	0,25	0,0064	0,22	0,24	0,23	0,23	0,0068	0,18	0,18	0,17	0,18	0,0074
1,88	0,30	0,29	0,29	0,29	0,0060	0,26	0,28	0,27	0,27	0,0091	0,20	0,21	0,20	0,20	0,0028
2,20	0,34	0,34	0,34	0,34	0,0041	0,30	0,32	0,31	0,31	0,0096	0,23	0,23	0,23	0,23	0,0006
2,58	0,40	0,39	0,39	0,39	0,0046	0,36	0,37	0,37	0,37	0,0091	0,27	0,27	0,27	0,27	0,0006
3,02	0,46	0,45	0,45	0,45	0,0041	0,42	0,44	0,43	0,43	0,0102	0,31	0,30	0,31	0,31	0,0051
3,53	0,53	0,52	0,52	0,52	0,0062	0,49	0,51	0,50	0,50	0,0096	0,35	0,35	0,36	0,35	0,0057
4,13	0,61	0,59	0,60	0,60	0,0074	0,57	0,58	0,58	0,58	0,0085	0,41	0,40	0,42	0,41	0,0085
4,84	0,70	0,69	0,70	0,70	0,0096	0,66	0,67	0,67	0,67	0,0068	0,48	0,47	0,49	0,48	0,0108
5,67	0,82	0,79	0,80	0,80	0,0122	0,77	0,79	0,78	0,78	0,0062	0,55	0,54	0,56	0,55	0,0113
6,63	0,94	0,92	0,93	0,93	0,0136	0,90	0,92	0,91	0,91	0,0079	0,64	0,63	0,66	0,64	0,0153
7,77	1,09	1,06	1,08	1,08	0,0173	1,06	1,07	1,07	1,07	0,0057	0,75	0,73	0,76	0,75	0,0170
9,09	1,26	1,24	1,25	1,25	0,0113	1,23	1,24	1,24	1,24	0,0057	0,87	0,85	0,88	0,87	0,0204
10,60	1,46	1,43	1,45	1,45	0,0173	1,44	1,44	1,44	1,44	0,0000	1,01	0,99	1,03	1,01	0,0226
12,50	1,69	1,65	1,67	1,67	0,0226	1,68	1,67	1,68	1,68	0,0057	1,18	1,16	1,20	1,18	0,0226
14,60	1,96	1,91	1,94	1,94	0,0285	1,96	1,95	1,96	1,96	0,0057	1,38	1,37	1,39	1,38	0,0113
17,10	2,27	2,22	2,25	2,25	0,0285	2,30	2,29	2,30	2,30	0,0057	1,62	1,62	1,62	1,62	-
20,00	2,63	2,57	2,60	2,60	0,0339	2,67	2,65	2,66	2,66	0,0113	1,90	1,91	1,89	1,90	0,0113
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0611	0,0571	0,0586	-	-	0,0125	0,0316	0,0220	-	-	0,0210	0,0261	0,0235	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,1299	0,1270	0,1288	0,1287	0,0016	0,1336	0,1318	0,1327	0,1327	0,0010	0,0932	0,0928	0,0937	0,0936	0,0004
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Tabla 7.3. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween® 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 40 °C.

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (0% p/p)					Agua (10% p/p)					Agua (20% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0006	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0021	0,10	0,09	0,10	0,10	0,0022
1,17	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0009	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0013	0,11	0,11	0,11	0,11	0,0017
1,37	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0019	0,11	0,11	0,11	0,11	0,0026	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0035
1,60	0,11	0,10	0,11	0,10	0,0020	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0033	0,16	0,15	0,15	0,15	0,0026
1,88	0,12	0,12	0,12	0,12	0,0011	0,15	0,15	0,15	0,15	0,0030	0,18	0,18	0,18	0,18	0,0024
2,20	0,14	0,14	0,14	0,14	-	0,17	0,17	0,17	0,17	0,0028	0,21	0,21	0,21	0,21	0,0043
2,58	0,17	0,17	0,17	0,17	0,0013	0,20	0,20	0,20	0,20	0,0024	0,25	0,24	0,24	0,24	0,0036
3,02	0,20	0,20	0,20	0,20	0,0013	0,24	0,23	0,23	0,24	0,0030	0,29	0,29	0,28	0,29	0,0028
3,53	0,23	0,23	0,23	0,23	0,0017	0,28	0,28	0,28	0,28	0,0030	0,34	0,33	0,33	0,33	0,0028
4,13	0,27	0,27	0,27	0,27	0,0013	0,33	0,32	0,32	0,32	0,0030	0,40	0,39	0,39	0,39	0,0039
4,84	0,32	0,32	0,32	0,32	0,0007	0,38	0,38	0,38	0,38	0,0041	0,46	0,46	0,46	0,46	0,0030
5,67	0,37	0,37	0,37	0,37	0,0023	0,45	0,44	0,44	0,44	0,0052	0,54	0,54	0,53	0,54	0,0046
6,63	0,43	0,43	0,43	0,43	0,0013	0,52	0,52	0,52	0,52	0,0036	0,63	0,63	0,62	0,63	0,0043
7,77	0,51	0,50	0,51	0,51	0,0024	0,61	0,60	0,60	0,61	0,0043	0,74	0,73	0,73	0,73	0,0043
9,09	0,59	0,59	0,59	0,59	0,0007	0,71	0,71	0,71	0,71	0,0056	0,87	0,86	0,86	0,86	0,0057
10,60	0,69	0,69	0,69	0,69	0,0023	0,83	0,83	0,83	0,83	0,0047	1,01	1,00	1,00	1,00	0,0065
12,50	0,81	0,81	0,81	0,81	0,0020	0,98	0,97	0,97	0,97	0,0063	1,18	1,18	1,17	1,18	0,0065
14,60	0,95	0,95	0,95	0,95	0,0028	1,14	1,14	1,13	1,14	0,0065	1,38	1,38	1,37	1,38	0,0065
17,10	1,11	1,11	1,11	1,11	-	1,34	1,33	1,32	1,33	0,0113	1,62	1,61	1,61	1,61	0,0065
20,00	1,30	1,30	1,30	1,30	-	1,57	1,56	1,55	1,56	0,0113	1,90	1,89	1,88	1,89	0,0113
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0015	-4,1·10 ⁻⁵	0,0003	-	-	0,0026	-0,0009	0,0006	-	-	0,0032	-0,0001	-1,46·10 ⁻⁵	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0650	0,0650	0,0650	0,0650	3,8·10 ⁻⁵	0,0782	0,0779	0,0774	0,0779	0,0005	0,0946	0,0944	0,0940	0,0943	0,0004
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (40% p/p)					Agua (50% p/p)					Agua (60% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,14	0,13	0,13	0,13	0,0041	0,12	0,13	0,11	0,12	0,0091	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0019
1,17	0,15	0,15	0,16	0,15	0,0071	0,14	0,15	0,13	0,14	0,0103	0,12	0,11	0,11	0,11	0,0045
1,37	0,17	0,17	0,18	0,17	0,0062	0,16	0,18	0,15	0,16	0,0127	0,14	0,13	0,13	0,13	0,0045
1,60	0,20	0,20	0,19	0,20	0,0071	0,19	0,20	0,18	0,19	0,0132	0,16	0,15	0,15	0,15	0,0051
1,88	0,23	0,23	0,23	0,23	0,0026	0,22	0,24	0,21	0,22	0,0150	0,18	0,18	0,18	0,18	0,0045
2,20	0,27	0,26	0,27	0,27	0,0035	0,26	0,28	0,25	0,26	0,0167	0,21	0,20	0,21	0,21	0,0034
2,58	0,31	0,30	0,30	0,31	0,0063	0,30	0,33	0,30	0,31	0,0160	0,24	0,24	0,24	0,24	0,0023
3,02	0,36	0,35	0,36	0,35	0,0060	0,35	0,38	0,35	0,36	0,0148	0,28	0,27	0,28	0,28	0,0045
3,53	0,41	0,41	0,41	0,41	0,0045	0,41	0,43	0,42	0,42	0,0125	0,32	0,32	0,32	0,32	0,0034
4,13	0,48	0,47	0,47	0,47	0,0060	0,48	0,50	0,50	0,49	0,0124	0,37	0,37	0,37	0,37	0,0051
4,84	0,56	0,54	0,55	0,55	0,0074	0,56	0,58	0,58	0,57	0,0108	0,43	0,42	0,43	0,43	0,0040
5,67	0,65	0,63	0,64	0,64	0,0074	0,65	0,67	0,67	0,66	0,0083	0,50	0,49	0,50	0,50	0,0045
6,63	0,75	0,73	0,74	0,74	0,0103	0,76	0,78	0,77	0,77	0,0085	0,58	0,58	0,58	0,58	0,0034
7,77	0,86	0,85	0,85	0,85	0,0082	0,88	0,91	0,89	0,89	0,0152	0,68	0,67	0,67	0,67	0,0051
9,09	1,00	0,98	0,99	0,99	0,0091	1,02	1,06	1,03	1,04	0,0236	0,79	0,78	0,78	0,78	0,0051
10,60	1,15	1,13	1,14	1,14	0,0113	1,19	1,22	1,20	1,20	0,0173	0,91	0,90	0,91	0,91	0,0068
12,50	1,34	1,31	1,33	1,33	0,0170	1,40	1,40	1,40	1,40	0,0000	1,06	1,05	1,06	1,06	0,0057
14,60	1,55	1,52	1,55	1,54	0,0196	1,63	1,62	1,61	1,62	0,0113	1,24	1,22	1,23	1,23	0,0113
17,10	1,79	1,76	1,78	1,78	0,0173	1,89	1,90	1,86	1,88	0,0236	1,43	1,42	1,43	1,43	0,0057
20,00	2,08	2,03	2,06	2,06	0,0283	2,22	2,19	2,18	2,20	0,0236	1,67	1,65	1,66	1,66	0,0113
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0473	0,0463	0,0468	-	-	0,0170	0,0418	0,0245	-	-	0,0277	0,0233	0,0256	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,1028	0,1007	0,1018	0,1018	0,0012	0,1104	0,1088	0,1089	0,1094	0,0010	0,0826	0,0820	0,0823	0,0823	0,0004
Coefficiente de correlación	0,9998	0,9998	0,9998	-	-	0,9998	0,9997	0,9996	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9995	0,9994	0,9995	-	-	0,9995	0,9994	0,9991	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Tabla 7.4. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween® 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 50 °C.

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (0% p/p)					Agua (10% p/p)					Agua (20% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,05	0,04	0,04	0,04	0,0027	0,05	0,05	0,05	0,05	0,0020	0,06	0,06	0,06	0,06	0,0014
1,17	0,05	0,05	0,05	0,05	0,0015	0,06	0,06	0,06	0,06	0,0010	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0019
1,37	0,06	0,06	0,06	0,06	0,0005	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0022	0,09	0,08	0,08	0,08	0,0022
1,60	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0011	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0029	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0014
1,88	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0005	0,10	0,09	0,09	0,09	0,0027	0,12	0,11	0,11	0,11	0,0026
2,20	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0008	0,11	0,11	0,11	0,11	0,0020	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0028
2,58	0,11	0,11	0,11	0,11	0,0011	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0024	0,16	0,15	0,15	0,16	0,0030
3,02	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0017	0,15	0,15	0,15	0,15	0,0026	0,19	0,18	0,18	0,18	0,0043
3,53	0,15	0,15	0,15	0,15	0,0013	0,18	0,17	0,17	0,18	0,0047	0,22	0,21	0,21	0,21	0,0039
4,13	0,18	0,17	0,18	0,18	0,0017	0,21	0,21	0,20	0,21	0,0024	0,25	0,25	0,24	0,25	0,0040
4,84	0,21	0,20	0,20	0,21	0,0020	0,24	0,24	0,24	0,24	0,0028	0,29	0,29	0,29	0,29	0,0039
5,67	0,24	0,24	0,24	0,24	0,0013	0,29	0,28	0,28	0,28	0,0043	0,35	0,34	0,34	0,34	0,0047
6,63	0,28	0,28	0,28	0,28	0,0024	0,33	0,33	0,33	0,33	0,0046	0,40	0,40	0,39	0,40	0,0053
7,77	0,33	0,33	0,33	0,33	0,0011	0,39	0,38	0,38	0,39	0,0052	0,47	0,46	0,46	0,47	0,0056
9,09	0,39	0,38	0,38	0,39	0,0030	0,46	0,45	0,45	0,45	0,0046	0,55	0,54	0,54	0,54	0,0056
10,60	0,45	0,45	0,45	0,45	0,0030	0,53	0,53	0,53	0,53	0,0059	0,64	0,64	0,63	0,64	0,0071
12,50	0,53	0,53	0,53	0,53	0,0030	0,62	0,62	0,62	0,62	0,0049	0,75	0,74	0,74	0,75	0,0060
14,60	0,62	0,62	0,62	0,62	0,0030	0,73	0,72	0,72	0,72	0,0075	0,88	0,87	0,87	0,87	0,0083
17,10	0,73	0,72	0,72	0,72	0,0026	0,85	0,84	0,84	0,85	0,0073	1,03	1,02	1,02	1,02	0,0065
20,00	0,85	0,84	0,84	0,85	0,0043	1,00	0,99	0,99	0,99	0,0078	1,20	1,19	1,19	1,19	0,0065
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0014	0,0006	$8,5 \cdot 10^{-5}$	-	-	0,0024	0,0004	$7,65 \cdot 10^{-5}$	-	-	0,0033	0,0002	-0,0005	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0424	0,0422	0,0422	0,0422	0,0001	0,0499	0,0493	0,0493	0,0495	0,0004	0,0600	0,0596	0,0595	0,0597	0,0003
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (40% p/p)					Agua (50% p/p)					Agua (60% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0012	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0020	0,07	0,06	0,07	0,07	0,0048
1,17	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0008	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0037	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0054
1,37	0,11	0,10	0,10	0,10	0,0017	0,10	0,09	0,09	0,09	0,0040	0,10	0,09	0,09	0,09	0,0059
1,60	0,12	0,12	0,12	0,12	-	0,12	0,11	0,11	0,11	0,0056	0,11	0,11	0,11	0,11	0,0045
1,88	0,14	0,14	0,14	0,14	-	0,13	0,12	0,13	0,13	0,0062	0,13	0,12	0,12	0,12	0,0045
2,20	0,16	0,16	0,16	0,16	0,0011	0,16	0,15	0,15	0,15	0,0046	0,15	0,14	0,15	0,15	0,0045
2,58	0,18	0,18	0,18	0,18	0,0017	0,18	0,18	0,18	0,18	0,0036	0,17	0,16	0,17	0,17	0,0057
3,02	0,21	0,21	0,21	0,21	0,0034	0,21	0,21	0,21	0,21	0,0023	0,20	0,19	0,19	0,19	0,0062
3,53	0,25	0,24	0,24	0,24	0,0023	0,25	0,24	0,25	0,25	0,0028	0,23	0,22	0,23	0,23	0,0068
4,13	0,29	0,28	0,28	0,28	0,0045	0,29	0,28	0,28	0,28	0,0045	0,27	0,26	0,26	0,26	0,0057
4,84	0,33	0,32	0,33	0,33	0,0068	0,33	0,33	0,32	0,33	0,0091	0,31	0,30	0,30	0,30	0,0068
5,67	0,38	0,37	0,38	0,38	0,0074	0,39	0,38	0,37	0,38	0,0113	0,36	0,35	0,35	0,35	0,0074
6,63	0,44	0,43	0,43	0,43	0,0079	0,44	0,43	0,43	0,43	0,0102	0,42	0,40	0,41	0,41	0,0085
7,77	0,51	0,49	0,50	0,50	0,0091	0,51	0,50	0,50	0,50	0,0102	0,48	0,47	0,48	0,48	0,0091
9,09	0,59	0,57	0,58	0,58	0,0108	0,60	0,58	0,58	0,58	0,0108	0,56	0,54	0,55	0,55	0,0102
10,60	0,68	0,66	0,67	0,67	0,0096	0,68	0,67	0,67	0,67	0,0109	0,65	0,63	0,64	0,64	0,0113
12,50	0,79	0,76	0,78	0,78	0,0147	0,79	0,78	0,76	0,78	0,0166	0,76	0,74	0,75	0,75	0,0102
14,60	0,91	0,88	0,90	0,90	0,0164	0,91	0,90	0,88	0,90	0,0160	0,87	0,86	0,87	0,87	0,0091
17,10	1,05	1,03	1,04	1,04	0,0113	1,06	1,03	1,03	1,04	0,0196	1,02	1,00	1,01	1,01	0,0124
20,00	1,22	1,18	1,20	1,20	0,0226	1,22	1,20	1,18	1,20	0,0226	1,18	1,16	1,17	1,17	0,0113
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0305	0,0313	0,0309	-	-	0,0268	0,0233	0,0241	-	-	0,0224	0,0139	0,0181	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0603	0,0584	0,0593	0,0593	0,0011	0,0608	0,0598	0,0590	0,0599	0,0010	0,0585	0,0577	0,0581	0,0581	0,0004
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9994	0,9993	0,9993	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9988	0,9986	0,9986	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Tabla 7.5. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween® 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 60 °C.

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (0% p/p)					Agua (10% p/p)					Agua (20% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,0008	0,03	0,03	0,03	0,03	0,0007	0,04	0,04	0,04	0,04	0,0010
1,17	0,03	0,03	0,03	0,03	0,0005	0,04	0,04	0,04	0,04	0,0006	0,05	0,04	0,05	0,05	0,0011
1,37	0,04	0,04	0,04	0,04	0,0009	0,05	0,05	0,04	0,05	0,0005	0,06	0,05	0,06	0,05	0,0013
1,60	0,05	0,05	0,05	0,05	0,0003	0,05	0,06	0,05	0,05	0,0018	0,06	0,06	0,06	0,06	0,0006
1,88	0,05	0,05	0,06	0,05	0,0009	0,06	0,06	0,06	0,06	0,0004	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0012
2,20	0,06	0,07	0,07	0,07	0,0009	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0008	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0011
2,58	0,08	0,08	0,07	0,07	0,0015	0,09	0,08	0,08	0,08	0,0007	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0011
3,02	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0006	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0011	0,12	0,12	0,12	0,12	0,0007
3,53	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0013	0,12	0,12	0,12	0,12	0,0011	0,14	0,14	0,14	0,14	0,0020
4,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,0007	0,14	0,13	0,14	0,14	0,0011	0,17	0,16	0,16	0,16	0,0020
4,84	0,14	0,14	0,14	0,14	0,0007	0,16	0,16	0,16	0,16	0,0011	0,19	0,19	0,19	0,19	0,0007
5,67	0,17	0,16	0,17	0,16	0,0007	0,19	0,19	0,19	0,19	0,0011	0,22	0,22	0,22	0,22	0,0011
6,63	0,19	0,19	0,19	0,19	0,0013	0,22	0,22	0,22	0,22	0,0011	0,26	0,26	0,26	0,26	0,0013
7,77	0,23	0,23	0,23	0,23	0,0007	0,26	0,26	0,26	0,26	0,0017	0,31	0,31	0,30	0,31	0,0024
9,09	0,26	0,26	0,26	0,26	0,0007	0,30	0,30	0,30	0,30	0,0011	0,36	0,36	0,36	0,36	0,0013
10,60	0,31	0,31	0,31	0,31	0,0007	0,35	0,35	0,35	0,35	0,0013	0,42	0,42	0,42	0,42	0,0023
12,50	0,36	0,36	0,36	0,36	0,0007	0,41	0,41	0,41	0,41	0,0013	0,49	0,49	0,49	0,49	0,0020
14,60	0,43	0,42	0,42	0,42	0,0017	0,48	0,48	0,48	0,48	0,0017	0,58	0,57	0,57	0,57	0,0028
17,10	0,50	0,50	0,50	0,50	0,0007	0,56	0,56	0,56	0,56	0,0020	0,67	0,67	0,67	0,67	0,0017
20,00	0,58	0,58	0,58	0,58	0,0007	0,66	0,66	0,66	0,66	0,0017	0,79	0,79	0,79	0,79	0,0036
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0004	0,0003	0,0001	-	-	0,0006	-5,8·10 ⁻⁵	-0,0001	-	-	0,0006	0,0002	-0,0001	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0291	0,0290	0,0290	0,0290	4,2·10 ⁻⁵	0,0329	0,0328	0,0328	0,0328	6,5·10 ⁻⁵	0,0395	0,0393	0,0393	0,0393	0,0001
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coefficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

Velocidad de cizalla [1/s]	Fuerza de cizalla [Pa]														
	Agua (40% p/p)					Agua (50% p/p)					Agua (60% p/p)				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	IC al 95%
1,00	0,05	0,05	0,05	0,05	0,0012	0,04	0,04	0,04	0,04	0,0040	0,04	0,04	0,04	0,04	0,0001
1,17	0,06	0,06	0,06	0,06	0,0005	0,04	0,05	0,05	0,04	0,0039	0,05	0,05	0,05	0,05	0,0004
1,37	0,07	0,06	0,07	0,07	0,0012	0,05	0,05	0,06	0,05	0,0053	0,06	0,06	0,06	0,06	0,0021
1,60	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0001	0,06	0,06	0,07	0,06	0,0058	0,07	0,07	0,07	0,07	0,0016
1,88	0,09	0,09	0,09	0,09	0,0008	0,07	0,07	0,08	0,07	0,0058	0,08	0,08	0,08	0,08	0,0008
2,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0014	0,08	0,09	0,09	0,09	0,0024	0,09	0,09	0,09	0,09	#1NUM!
2,58	0,12	0,11	0,11	0,11	0,0040	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0007	0,11	0,10	0,11	0,11	0,0017
3,02	0,13	0,13	0,13	0,13	0,0040	0,13	0,12	0,12	0,12	0,0041	0,12	0,12	0,12	0,12	0,0006
3,53	0,15	0,15	0,15	0,15	0,0040	0,15	0,14	0,14	0,14	0,0057	0,14	0,14	0,14	0,14	0,0011
4,13	0,18	0,17	0,17	0,17	0,0045	0,17	0,16	0,16	0,17	0,0079	0,17	0,17	0,17	0,17	0,0006
4,84	0,21	0,20	0,20	0,20	0,0062	0,20	0,19	0,19	0,19	0,0086	0,20	0,19	0,19	0,19	0,0023
5,67	0,24	0,23	0,23	0,23	0,0096	0,23	0,22	0,21	0,22	0,0079	0,23	0,23	0,23	0,23	0,0023
6,63	0,28	0,26	0,27	0,27	0,0096	0,26	0,26	0,24	0,25	0,0088	0,27	0,26	0,26	0,26	0,0023
7,77	0,32	0,31	0,31	0,31	0,0079	0,30	0,30	0,28	0,29	0,0078	0,31	0,31	0,31	0,31	0,0017
9,09	0,36	0,35	0,36	0,36	0,0062	0,34	0,34	0,33	0,34	0,0051	0,36	0,36	0,36	0,36	0,0028
10,60	0,42	0,40	0,41	0,41	0,0096	0,40	0,39	0,39	0,39	0,0085	0,42	0,42	0,42	0,42	0,0017
12,50	0,49	0,47	0,48	0,48	0,0108	0,47	0,45	0,44	0,45	0,0172	0,49	0,49	0,49	0,49	0,0040
14,60	0,56	0,54	0,55	0,55	0,0136	0,54	0,53	0,51	0,53	0,0158	0,58	0,57	0,57	0,57	0,0034
17,10	0,65	0,63	0,64	0,64	0,0091	0,62	0,60	0,60	0,60	0,0120	0,68	0,66	0,67	0,67	0,0068
20,00	0,75	0,73	0,74	0,74	0,0130	0,73	0,70	0,68	0,70	0,0257	0,79	0,78	0,78	0,78	0,0079
Características de la regresión															
Ordenada en el origen	0,0216	0,0195	0,0206	-	-	0,0096	0,0118	0,0162	-	-	0,0046	0,0049	0,0047	-	-
Viscosidad (Pa·s)	0,0370	0,0358	0,0364	0,0364	0,0007	0,0362	0,0350	0,0339	0,0350	0,0013	0,0393	0,0387	0,0390	0,0390	0,0003
Coeficiente de correlación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9989	0,9993	0,9995	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-
Coeficiente de determinación	0,9999	0,9999	0,9999	-	-	0,9979	0,9985	0,9990	-	-	0,9999	0,9999	0,9999	-	-

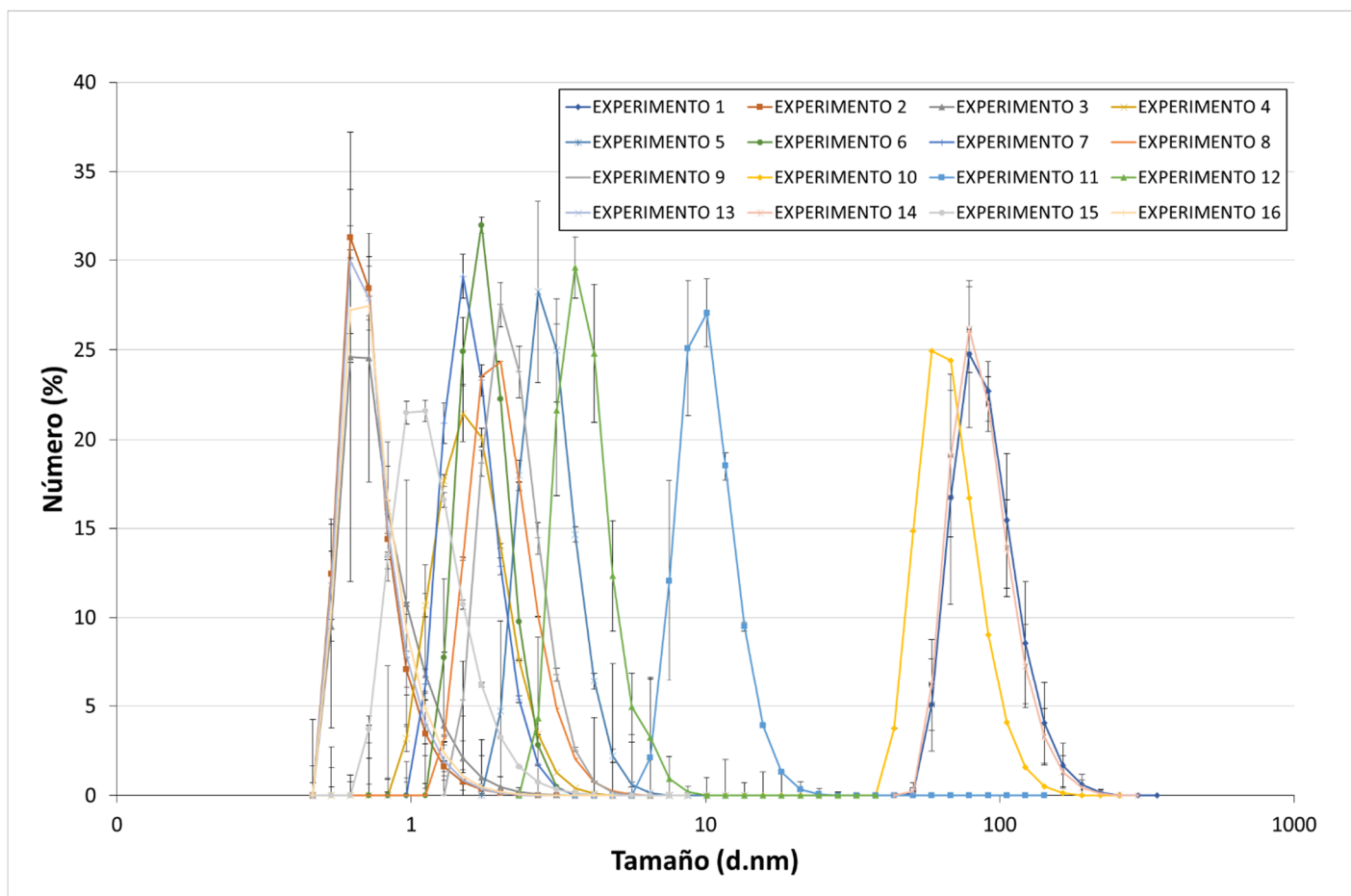


Figura 7.1. Distribución de tamaños de gotícula de cada experimento del diseño experimental (Valores medios \pm IC95%) (n=3).

Tabla 7.6. Informe final de resultados del modelo de conductividad.

Exp.	Valor real	Valor predicho	Residual	Nivel de influencia	Residual inter. estud.	Residual exter. estud.	Influencia de los valores ajustados	Distancia de Cook
1	69,54	72,20	-2,66	0,538	-1,525	-1,670	-1,802	0,452
2	14,57	13,35	1,22	0,360	0,593	0,571	0,428	0,033
3	11,09	12,79	-1,70	0,411	-0,866	-0,853	-0,713	0,087
4	21,26	21,58	-0,32	0,207	-0,141	-0,133	-0,088	0,001
5	17,02	18,01	-0,99	0,490	-0,539	-0,516	-0,506	0,046
6	13,21	11,28	1,93	0,418	0,987	0,986	0,836	0,117
7	10,68	11,41	-0,73	0,393	-0,364	0,346	-0,279	0,014
8	30,68	31,57	-0,89	0,345	-0,428	-0,408	-0,296	0,016
9	34,82	30,80	4,02	0,337	1,923	2,362	1,682	0,313
10	48,38	46,46	1,92	0,300	0,896	0,885	0,580	0,057
11	29,34	29,88	-0,54	0,44	-0,281	-0,266	-0,236	0,010
12	29,72	30,45	-0,73	0,234	-0,327	-0,310	-0,171	0,005
13	13,70	12,07	1,63	0,84	1,605	1,792	4,150	2,310
14	69,82	68,07	1,75	0,408	0,885	0,874	0,726	0,090
16	15,65	19,56	-3,91	0,274	-1,786	-0,297	-1,286	0,200

Abreviaturas: exp: experimento; estud: estudentizados; exter: externamente; inter: internamente.

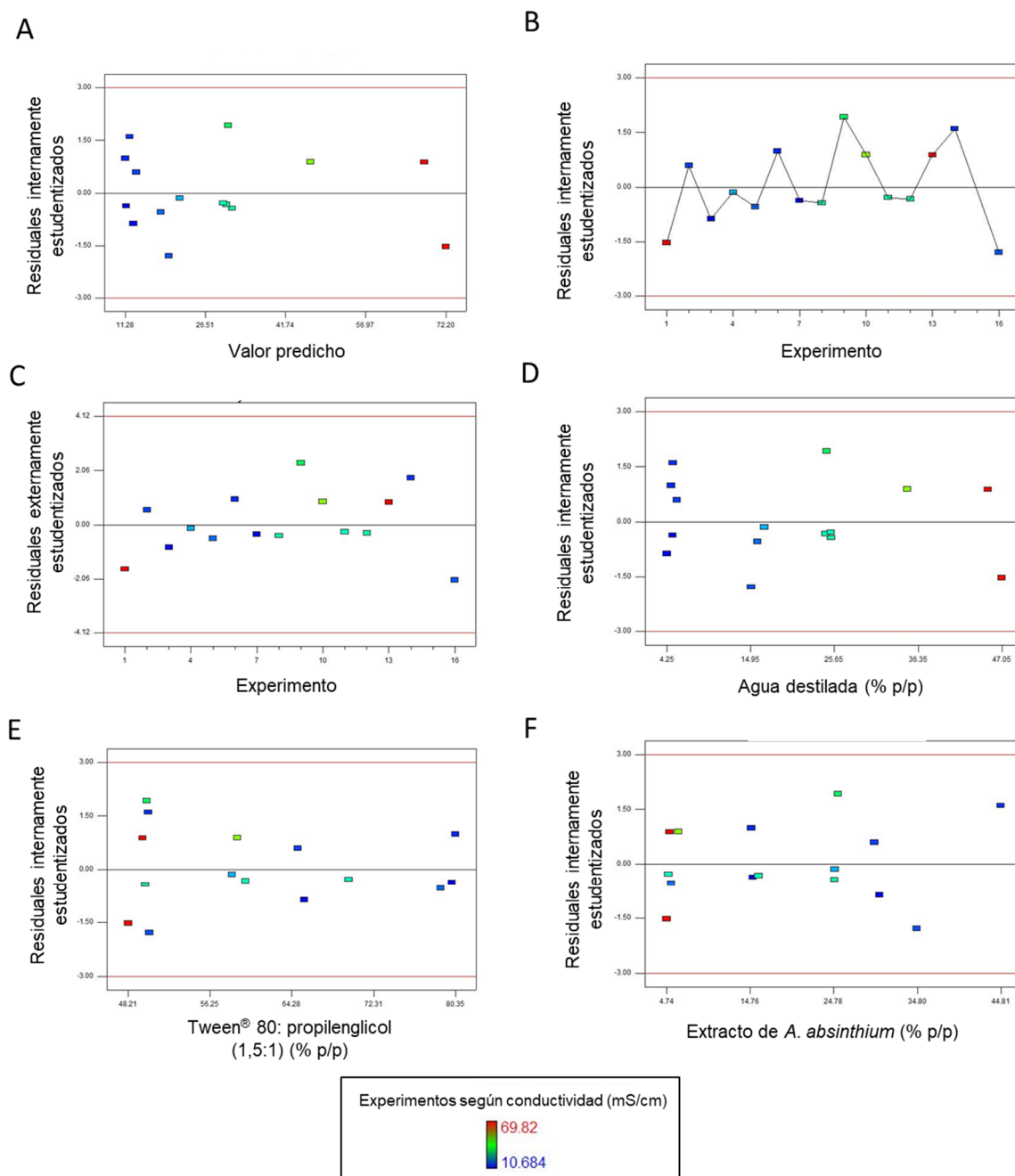


Figura 7.2. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B y C) y cada uno de los componentes de la microemulsión (D-F) en el modelo de conductividad.

Tabla 7.7. Informe final de resultados del modelo de diámetro medio de Sauter.

Exp.	Valor real	Valor predicho	Residual	Nivel de influencia	Residual inter. estud.	Residual exter. estud.	Influencia de los valores ajustados	Distancia de Cook
1	2,02	2,13	-0,110	0,539	-0,971	-0,968	-1,047	0,184
2	-0,06	0,09	-0,150	0,351	-1,134	-1,152	-0,847	0,116
3	0,02	0,07	-0,056	0,401	-0,455	-0,436	-0,357	0,023
4	0,29	0,28	0,009	0,202	0,062	0,059	0,030	0,000
5	0,52	0,75	-0,220	0,518	-2,013	-2,476	-2,570	0,725
6	0,28	0,14	0,150	0,400	1,205	1,236	1,010	0,161
7	0,25	0,14	0,110	0,377	0,882	0,871	0,677	0,078
8	0,38	0,36	0,023	0,345	0,180	0,171	0,124	0,003
9	0,40	0,34	0,060	0,336	0,460	0,441	0,314	0,018
10	1,90	1,59	0,300	0,307	2,270	3,094	2,060	0,380
11	1,23	1,24	-0,010	0,451	-0,087	-0,082	-0,075	0,001
12	0,65	0,75	-0,094	0,225	-0,666	-0,646	-0,348	0,021
13	-0,06	0,01	-0,063	0,431	-0,522	-0,502	-0,437	0,034
14	2,01	2,04	-0,030	0,408	-0,248	-0,236	-0,196	0,007
15	0,19	0,04	0,140	0,489	1,269	1,315	1,285	0,256
16	-0,04	0,03	-0,071	0,219	-0,504	-0,484	-0,257	0,012

Abreviaturas: exp: experimento; estud: estudentizados; exter: externamente; inter: internamente.

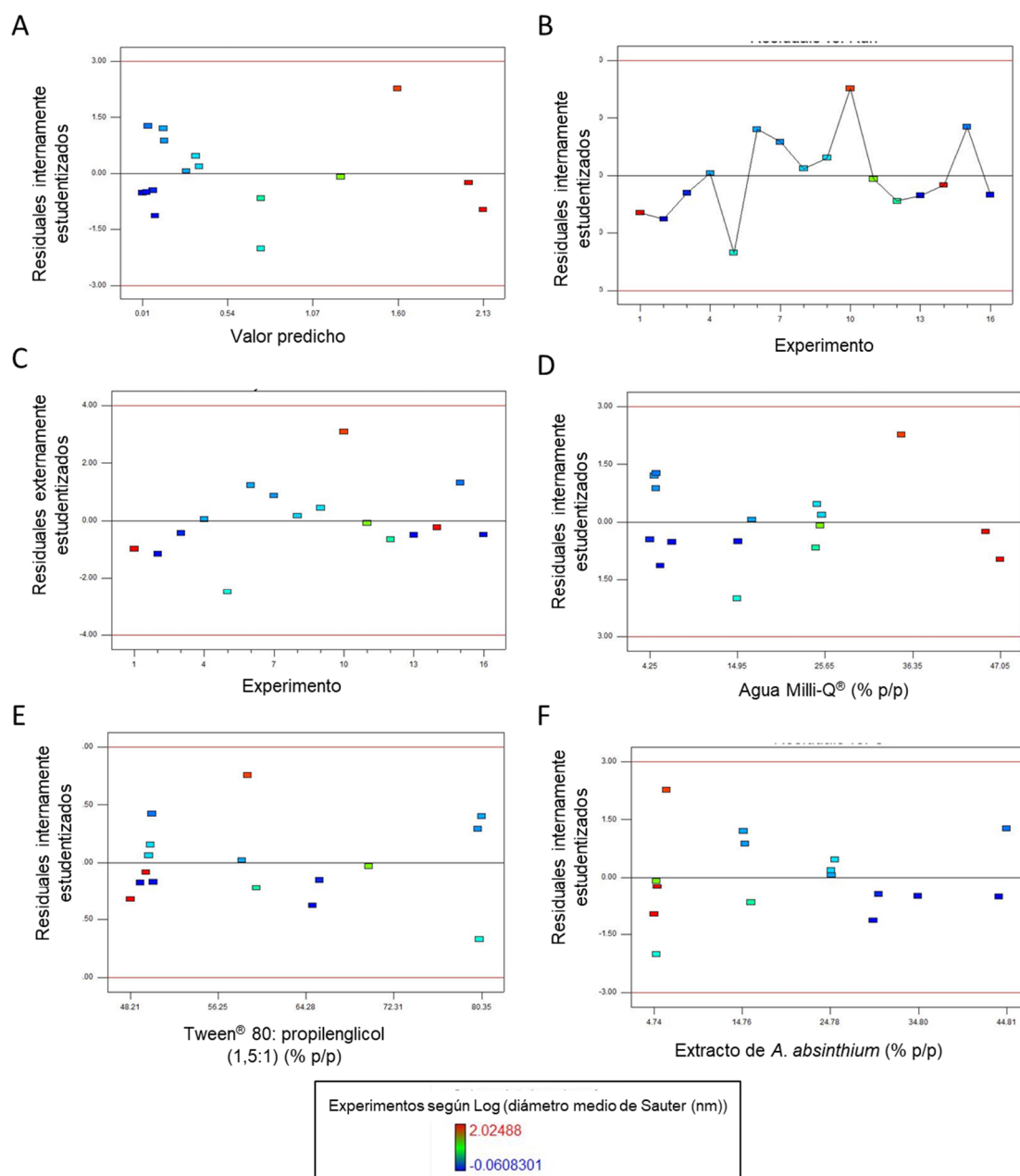


Figura 7.3. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B y C) y cada uno de los componentes de la microemulsión (D-F) en el modelo de diámetro medio de Sauter.

Tabla 7.8. Informe final del modelo de fuerza tensil.

Exp.	Valor real	Valor predicho	Residual	Nivel de influencia	Residual inter. estud.	Residual exter. estud.	Influencia de los valores ajustados	Distancia de Cook
1	2,05	2,60	-0,540	0,274	-2,175	-2,978	-1,827	0,297
2	0,39	0,43	-0,037	0,464	-0,170	-0,161	-0,150	0,004
3	2,70	2,63	0,067	0,472	0,313	0,296	0,280	0,015
4	2,23	2,42	-0,200	0,418	-0,872	-0,859	-0,729	0,091
5	2,51	2,68	-0,170	0,404	-0,770	-0,752	-0,619	0,067
6	2,65	2,42	0,230	0,392	1,023	1,027	0,825	0,113
7	0,88	1,10	-0,220	0,535	-1,101	-1,116	-1,198	0,233
8	2,20	2,09	0,100	0,403	0,463	0,442	0,363	0,024
10	2,70	2,68	0,018	0,404	0,079	0,074	0,061	0,001
12	0,52	0,43	0,094	0,464	0,437	0,416	0,388	0,028
13	2,57	2,27	0,300	0,161	1,113	1,130	0,495	0,040
14	2,29	2,42	-0,140	0,418	-0,606	-0,583	-0,495	0,044
16	2,60	2,42	0,180	0,392	0,809	0,792	0,636	0,070

Abreviaturas: exp: experimento; estud: estudentizados; exter: externamente; inter: internamente.

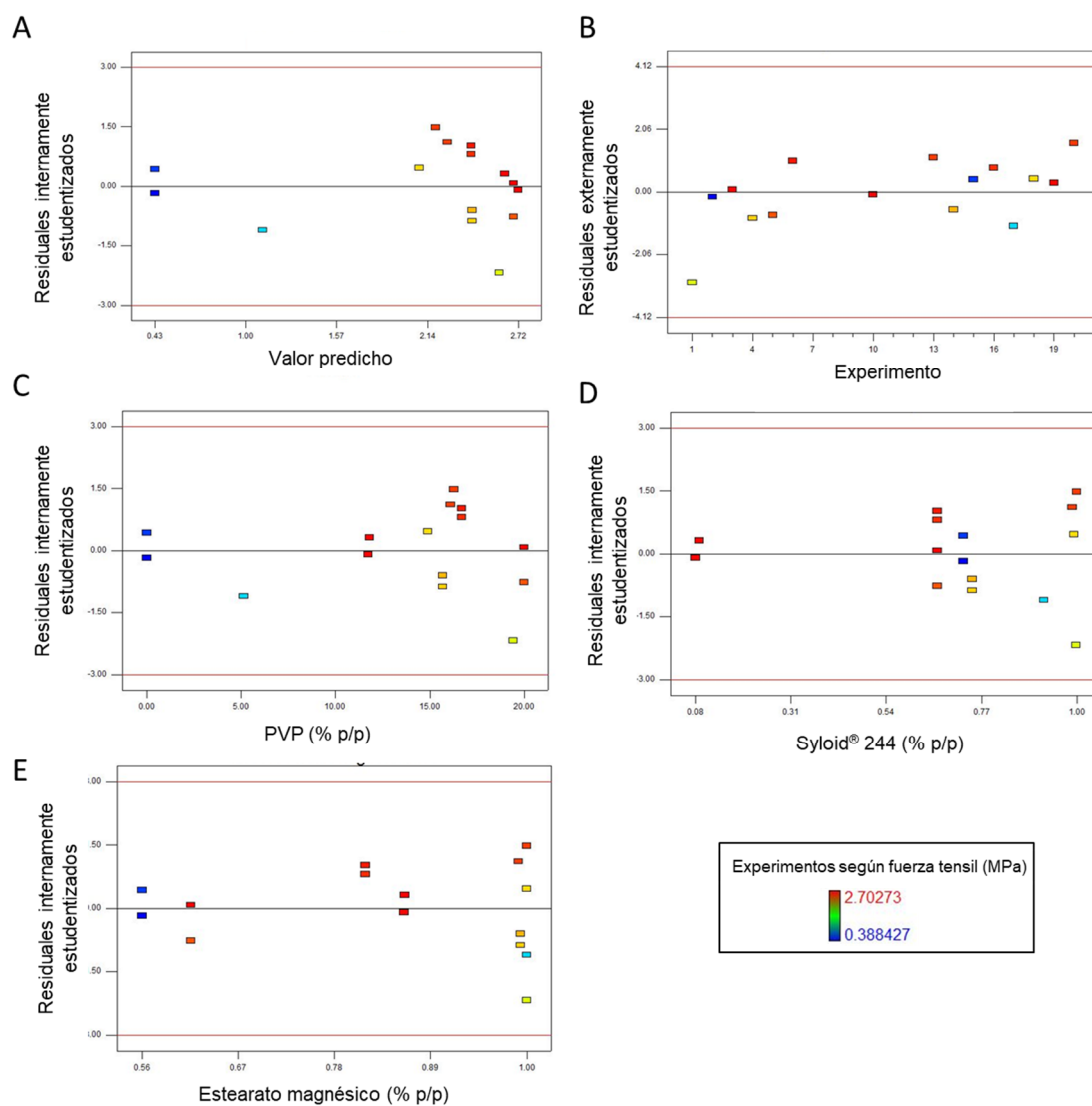


Figura 7.4. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B) y los componentes más influyentes de la formulación (C-E) en el modelo de fuerza tensil.

Tabla 7.9. Informe final del modelo de tiempo de desintegración.

Exp.	Valor real	Valor predicho	Residual	Nivel de influencia	Residual inter. estud.	Residual exter. estud.	Influencia de los valores ajustados	Distancia de Cook
1	5,60	6,61	-1,010	0,360	-1,060	-1,074	-0,805	0,105
2	0,30	0,42	-0,120	0,474	-0,136	-0,124	-0,118	0,003
3	5,55	7,11	-1,560	0,452	-1,779	-2,362	-2,15	0,436
5	9,22	7,11	2,100	0,452	2,392	10,150	9,22	0,788
6	6,40	6,59	-0,190	0,494	-0,223	-0,204	-0,202	0,008
9	1,50	0,95	0,550	0,799	1,032	1,039	2,070	0,705
10	5,67	5,72	-0,049	0,529	-0,061	-0,055	-0,059	0,001
11	7,38	7,31	0,077	0,454	0,088	0,080	0,073	0,001
12	5,67	5,74	-0,078	0,477	-0,091	-0,083	-0,079	0,001
13	7,38	7,18	0,200	0,539	0,252	0,231	0,250	0,011
15	0,20	0,42	-0,220	0,474	-0,252	-0,231	-0,219	0,010
16	6,95	6,59	0,360	0,494	0,428	0,397	0,393	0,030

Abreviaturas: exp: experimento; estud: estudentizados; exter: externamente; inter: internamente.

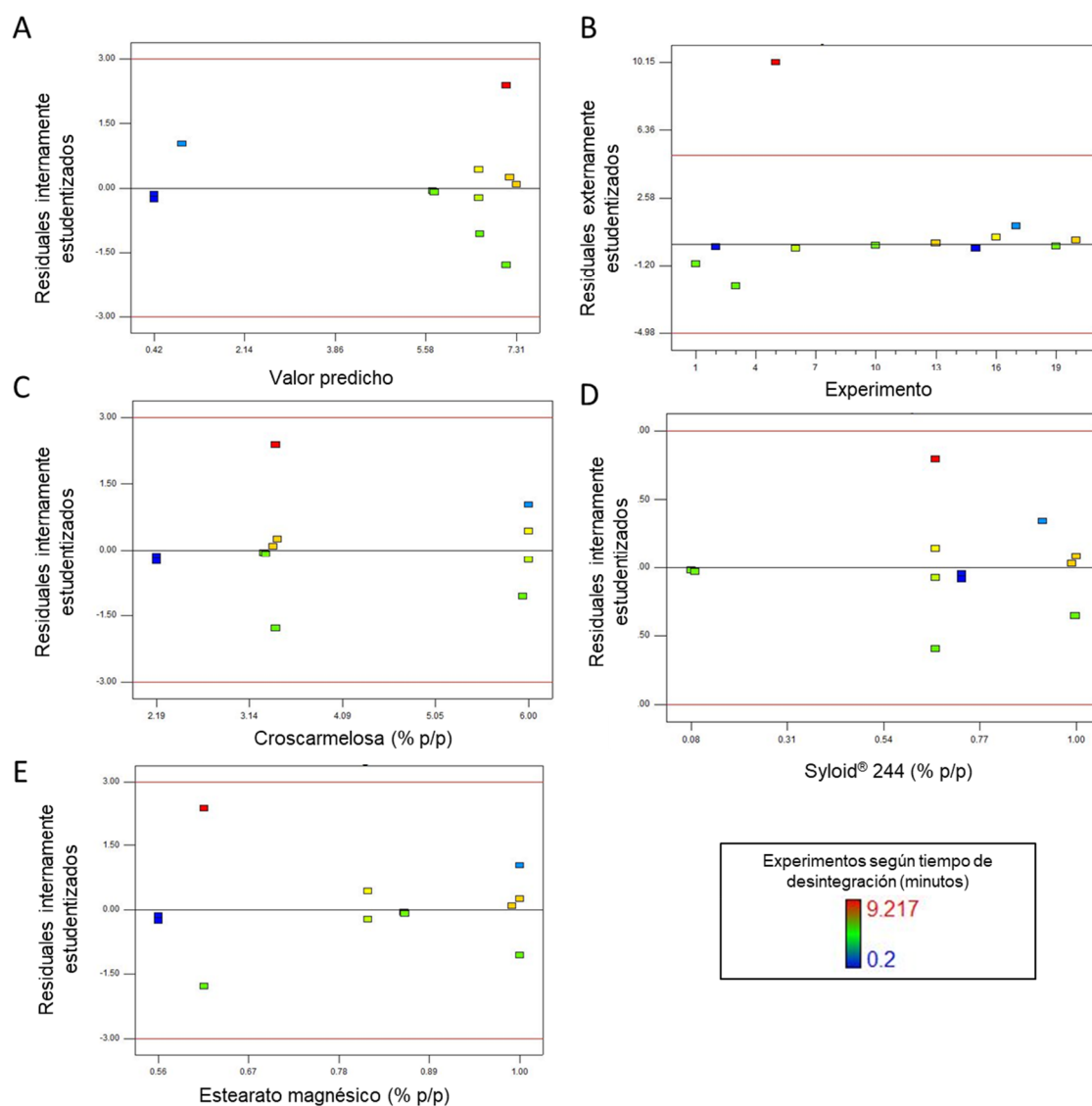


Figura 7.5. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B) y los componentes más influyentes de la formulación (C-E) en el modelo de tiempo de desintegración.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición del aceite esencial de la población SN1 de <i>A. absinthium</i> recolectada en 2010.....	31
Tabla 1.2. Mezcla de emulgente y coemulgente y su contenido en agua..	52
Tabla 1.3. Características y propiedades de 3 derivados de sílice utilizados en la absorción de formulaciones lipídicas.....	61
Tabla 1.4. Cinéticas de liberación.....	65
Tabla 1.5. Composición de una formulación en comprimidos.....	68
Tabla 1.6. Expresiones matemáticas de los diferentes modelos de diseño de mezclas. .	77
Tabla 1.7. Análisis de la varianza.	80
Tabla 1.8. Valores de λ y su correspondiente transformación de la respuesta.	87
Tabla 3.1. Límites máximos y mínimos para la optimización de la composición de la microemulsión.	111
Tabla 3.2. Composición del medio HBSS.....	112
Tabla 3.3. Composición de las formulaciones utilizadas en el experimento <i>ex vivo</i>	115
Tabla 3.4. Composición de las formulaciones analizadas.....	119
Tabla 3.5. Composición de las formulaciones analizadas.....	121
Tabla 3.6. Límites máximos y mínimos para cada componente de la formulación.	121
Tabla 3.7. Límites máximo y mínimo para la optimización de la formulación en comprimidos.	123
Tabla 4.1. Relación entre el valor de HLB y el área de microemulsión de cada mezcla.	134
Tabla 4.2. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween [®] 80: propilenglicol (1:1 p/p) al incorporar agua.....	136
Tabla 4.3. Conductancia de las soluciones patrón de KCl.....	139
Tabla 4.4. Resultados de la regresión.	139
Tabla 4.5. Resultados del análisis de la varianza.....	139
Tabla 4.6. Resultados del análisis de la varianza.....	139
Tabla 4.7. Resultados del análisis de conductividad de una línea de dilución. A: agua (% p/p); B: conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$). n= 3. IC: intervalo de confianza al 95%.	140

Tabla 4.8. Resultados del análisis de regresión lineal.	142
Tabla 4.9. Resultados del análisis de regresión polinomial.	142
Tabla 4.10. Composición de los experimentos del diseño de mezclas.	144
Tabla 4.11. Resultados de las cinco medidas de conductividad de los 16 experimentos del diseño de mezclas.....	145
Tabla 4.12. Resumen del análisis estadístico de los modelos ajustados a los resultados de conductividad.	145
Tabla 4.13. Resultados del modelo cuadrático adaptado a las medidas de conductividad.	146
Tabla 4.14. Resultados de tamaño de gotícula.	149
Tabla 4.15. Análisis estadístico de los resultados de tamaño de gotícula.....	150
Tabla 4.16. Resultados del modelo cuadrático basado en los resultados del tamaño de gotícula.	151
Tabla 4.17. Resultados del diámetro medio de Sauter tras la dispersión a los 15 y a los 30 minutos de la microemulsión optimizada.....	155
Tabla 4.18. Resultados de transmitancia según el tiempo de dispersión de la microemulsión optimizada.	155
Tabla 4.19. Resultados del análisis reológico del extracto de <i>A. absinthium</i> a 25° C. .	156
Tabla 4.20. Resultados del estudio de reología de la microemulsión a 25°, 30° y 37° C.	158
Tabla 4.21. Número medio de parásitos y porcentajes de reducción por grupo.	160
Tabla 4.22. Resultados del ensayo de dispersión del sistema formado por Syloid® y la microemulsión de extracto de <i>A. absinthium</i>	165
Tabla 4.23. Tiempo medio de disolución (TMD) y eficacia de disolución (ED).....	166
Tabla 4.24. Resultado del ajuste de diferentes cinéticas.....	166
Tabla 4.25. Resultados de absorbancia a los 15 días de preparación del sistema.	168
Tabla 4.26. Tiempo medio de disolución (TMD) y eficacia de disolución (ED) a los 15 días de preparación.	168
Tabla 4.27. Resultado del ajuste de diferentes cinéticas después de 15 días de la preparación del sistema.	169
Tabla 4.28. Resultados de absorbancia a los 90 días de reposición.....	169

Tabla 4.29. Tiempo medio de disolución (TMD) y eficacia de disolución (ED) a los 90 días de preparación.	170
Tabla 4.30. Resultado del ajuste de diferentes cinéticas después de 90 días de la preparación del sistema.	171
Tabla 4.31. Valores de p calculados para cada condición: inicial, a los 15 y a los 90 días de reposición.....	173
Tabla 4.32. Parámetros de flujo del material de sílice vacío y cargado con la microemulsión. Valores medios (n=3).....	174
Tabla 4.33. Fuerza tensil de las formaciones con diferente aglomerante y fuerza de compresión (n=10).....	175
Tabla 4.34. Composición y resultados de los experimentos del diseño experimental (n=3).....	178
Tabla 4.35. Resultados de fuerza tensil de las formulaciones del diseño experimental (n=10).....	179
Tabla 4.36. Características del modelo de fuerza tensil (MPa).....	180
Tabla 4.37. Resultados de tiempo de desintegración de las formulaciones del diseño experimental.	183
Tabla 4.38. Características del modelo de tiempo de desintegración (min/g).	184
Tabla 4.39. Resultados teóricos y experimentales de la formulación optimizada.....	188
Tabla 7.1. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween [®] 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 30 °C.	215
Tabla 7.2. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween [®] 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 37 °C.	217
Tabla 7.3. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween [®] 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 40 °C.	219
Tabla 7.4. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween [®] 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 50 °C.	221
Tabla 7.5. Resultados de los estudios de viscosidad de la combinación Tween [®] 80: propilenglicol (1,5:1 p/p) al incorporar agua a 60 °C.	223
Tabla 7.6. Informe final de resultados del modelo de conductividad.....	226
Tabla 7.7. Informe final de resultados del modelo de diámetro medio de Sauter.....	228
Tabla 7.8. Informe final del modelo de fuerza tensil.....	230
Tabla 7.9. Informe final del modelo de tiempo de desintegración.	232

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de las etapas principales del ciclo biológico de los nematodos...	13
Figura 1.2. Morfología general de un nematodo adulto: macho (A) y hembra (B).....	14
Figura 1.3. Esquema de la estructura de la cutícula de los nematodos. Abreviaturas: ep: epicutícula; c: corteza; ml: capa media (acuosa); bl: capa basal compuesta; h: hipodermis; m: músculo.....	16
Figura 1.4. Disposición de los cordones en la zona esofágica (A) y media intestinal (B)..	17
Figura 1.5. Ciclo biológico de <i>T. spiralis</i>	21
Figura 1.6. Metabolismo de primer paso hepático de albendazol..	24
Figura 1.7. Estructura molecular de los derivados monoterpénicos alfa-tujona (Izda.) y beta-tujona (Der.).....	30
Figura 1.8. Aspecto de los cultivos de <i>A. absinthium</i> en Ejea de los Caballeros (Zaragoza) (A) y planta piloto de extracción (B)..	31
Figura 1.9. Estructuras químicas de los compuestos (Z)-epoxiocimeno (A), (Z)-crisantenol (B), (E)-cariofileno (C), linalool (D) y germacreno D (E).....	32
Figura 1.10. Eficacia <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> del aceite esencial de <i>A. absinthium</i> SN1-2010 en un modelo murino de <i>T. spiralis</i>	33
Figura 1.11. Disposición de las moléculas de emulgente y coemulgente en la interfaz entre la fase oleosa (O) y acuosa (A)..	36
Figura 1.12. Cambio en la estructura del sistema, al incrementar su contenido en emulgente.	37
Figura 1.13. Sistemas de Winsor en función de la temperatura y de la concentración de tensoactivo del sistema.....	38
Figura 1.14. Esquema de las diferentes estructuras observadas en un diagrama ternario a una determinada temperatura.....	39
Figura 1.15. Efecto de la geometría del emulgente en el signo y en las estructuras del sistema.....	41
Figura 1.16. Diagrama de la variación en la energía libre durante la formación de una microemulsión..	44
Figura 1.17. Esquema del método de valoración.....	47
Figura 1.18. Apariencia de una microemulsión (izquierda) una microemulsión con cristales líquidos (centro) y una emulsión (derecha)..	49

Figura 1.19. Variación en la conductividad según el contenido en agua (A) y derivada de la conductividad en función del contenido en agua (B)..	51
Figura 1.20. Cambios en la viscosidad y en la conductividad de una microemulsión de ciclosporina A según el contenido en agua..	53
Figura 1.21. Disposición de los componentes de un equipo de DLS y análisis de partículas..	56
Figura 1.22. Estructura de silicagel mesoporoso (Syloid® XDP).....	59
Figura 1.23. Esquema (A) y aspecto real (B) del sistema de medida de la fuerza de fractura del comprimido.....	69
Figura 1.24. Estructura del equipo de desintegración (medidas expresadas en mm)..	70
Figura 1.25. Región experimental de un diseño de mezclas de 3 componentes y su diagrama ternario.	73
Figura 1.26. Área experimental global y delimitada por el contenido de los pseudocomponentes X_1 , X_2 y X_3	74
Figura 1.27. Diseño de experimentos <i>Simplex Lattice</i> (3,2) (A) y (3,3) (B).....	75
Figura 1.28. Diseño de experimentos <i>Simplex Centroid</i> (3,2) (A) y (3,3) (B).....	76
Figura 1.29. Análisis de residuales: gráfico de normalidad (A) y representación de residuales respecto de respuesta predicha (y_i).	84
Figura 1.30. Ejemplo de gráfico procedente del método Box y Cox.....	88
Figura 3.1. Estructura molecular de los componentes del Labrasol®.	99
Figura 3.2. Estructura molecular del Tween® 80.....	100
Figura 3.3. Estructura molecular del Lauroglycol® FCC.....	100
Figura 3.4. Estructura molecular del Plurol Oleique®.	101
Figura 3.5. Estructura molecular de propilenglicol..	101
Figura 3.6. Esquema de la composición de las formulaciones de aceite de oliva.	102
Figura 3.7. Selección de la combinación emulgente:coemulgente.....	103
Figura 3.8. Composición de las formulaciones de extracto de <i>A. absinthium</i>	104
Figura 3.9. Diagrama pseudoternario mostrando la composición de una línea de dilución.....	105
Figura 3.10. Viscosímetro MCR102.....	105

Figura 3.11. Conductímetro Metrohm 644 y una celda de conductividad Crison 5292 con platos de platino paralelos.....	106
Figura 3.12. Área de optimización en el diagrama ternario.....	108
Figura 3.13. Celda capilar plegada: exterior (A) y esquema (B).	109
Figura 3.14. Esquema del experimento <i>ex vivo</i>	114
Figura 3.15. Aspecto de la máquina de análisis de materiales (A) y detalle del punzón (B).	120
Figura 4.1. Diagramas pseudoternarios de las mezclas de Labrasol® y Lauroglycol® en proporciones 4:1 (A) y 1:1 (B).	126
Figura 4.2. Diagramas pseudoternarios de las mezclas de Labrasol® y Plurol Oleique® en proporciones 4:1 (A), 2:1 (B) y 1:1 (C).....	128
Figura 4.3. Relación entre las cantidades máximas de agua incorporada en las diferentes mezclas de emulgentes y coemulgentes.....	129
Figura 4.4. Apariencia y composición (% p/p) de las formulaciones con diferentes mezclas de emulgentes y coemulgentes.....	130
Figura 4.5. Diagramas pseudoternarios de mezclas formadas por Tween® 80 y propilenglicol: 3:1p/p (A), 2:1 p/p (B), 1.5:1 p/p (C) y 1:1 p/p (D).	132
Figura 4.6. Relación de la viscosidad respecto del contenido en agua. Valores medios \pm IC95% (n=3).....	138
Figura 4.7. Recta de regresión de la conductividad respecto de la conductancia.....	139
Figura 4.8. Cambio en la conductividad respecto al contenido en agua (% p/p). Valores medios \pm IC95% (n=3).....	141
Figura 4.9. Derivada de la conductividad respecto del contenido en agua.	143
Figura 4.10. Distribución de los experimentos y la distribución del error estándar en el diagrama pseudoternario.	144
Figura 4.11. Gráfico del método Box y Cox del modelo de conductividad.....	146
Figura 4.12. Comparación de los valores predichos y reales del modelo de conductividad.....	147
Figura 4.13. Gráfico de probabilidad normal del modelo de conductividad.....	147
Figura 4.14. Resultados del modelo de conductividad (mS/cm).....	148
Figura 4.15. Gráfico del método Box y Cox del modelo de tamaño de gotícula.	150
Figura 4.16. Comparación de los valores predichos y reales del modelo del tamaño de gotícula.	151

Figura 4.17. Gráfico de probabilidad normal del modelo del tamaño de gotícula.	152
Figura 4.18. Representación de los resultados de diámetro medio de Sauter (nm).	153
Figura 4.19. Composición y tamaño de gotícula de los experimentos 2 y 3 y de la microemulsión optimizada mediante un modelo teórico.	154
Figura 4.20. Distribución del tamaño de gotícula a los 15 y a los 30 minutos (Valores medios \pm DE) (n=3).	155
Figura 4.21. Resultados del estudio reológico del extracto de <i>A. absinthium</i> (25° C y la microemulsión a 25°, 30° y 37° C.	159
Figura 4.22. Imagen microscópica de las larvas L1 de <i>T. spiralis</i> (A), administración por sonda buco gástrica de las formulaciones (B) y ratones Swiss CD1 (C).	160
Figura 4.23. Número medio de parásitos adultos por grupo (Valores medios \pm IC 95%) (n = 6).	161
Figura 4.24. Material de Syloid® XDP 3150 cargado con la microemulsión optimizada.	162
Figura 4.25. Apariencia del material de sílice Syloid® XDP cargado con la microemulsión (1:1,5) a 40x (A) y 100x (B).	162
Figura 4.26. Espectros del estudio de dispersión.	164
Figura 4.27. Espectro de absorción de una muestra del estudio de velocidad de dispersión a los 30 minutos.	165
Figura 4.28. Microemulsión liberada del material de sílice en función del tiempo (Valores medios \pm IC95%) (n=3).	166
Figura 4.29. Cinética de primer orden de la liberación de la microemulsión a partir del material de sílice.	167
Figura 4.30. Cinética de liberación de la microemulsión tras 15 días de su inclusión en el material de sílice. Valores medios \pm IC95% (n=3).	168
Figura 4.31. Cinética de liberación de la microemulsión tras 90 días de su inclusión en el material de sílice. Valores medios \pm IC95% (n=3).	170
Figura 4.32. Perfil de dispersión de la emulsión de <i>A. absinthium</i> procedente del sistema cargado a tiempo inicial, a los 15 días y 90 días de preparación. Valores medios \pm IC95% (n=3).	172
Figura 4.33. Comparación de la eficacia de disolución y de los tiempos medios de disolución en el tiempo inicial, a los 15 y a los 90 días de reposición. Valores medios \pm IC95% (n=3).	173
Figura 4.34. Aspecto de los comprimidos: altura (A) y diámetro (B).	174

Figura 4.35. Fuerza tensil con diferentes aglomerantes. Valores medios \pm IC95% (n=10).....	176
Figura 4.36. Fuerza tensil a diferentes fuerzas de compresión. Valores medios \pm IC95% (n=10).....	176
Figura 4.37. Gráfico del método Box y Cox del modelo de fuerza tensil.....	180
Figura 4.38. Comparación de resultados predichos y resultados actuales del modelo fuerza tensil.	181
Figura 4.39. Gráfico de probabilidad normal de los residuales del modelo de fuerza tensil.	181
Figura 4.40. Gráfico del método Box y Cox del modelo de tiempo de desintegración.	184
Figura 4.41. Comparación de resultados predichos y resultados actuales del modelo de tiempo de desintegración.....	185
Figura 4.42. Gráfico de probabilidad normal de los residuales del modelo de tiempo de desintegración.	185
Figura 4.43. Composición de la formulación de comprimidos optimizada (% p/p).....	187
Figura 4.44. Comparativa de la fuerza tensil (A) y el tiempo de desintegración (B)..	188
Figura 7.1. Distribución de tamaños de gotícula de cada experimento del diseño experimental (Valores medios \pm IC95%) (n=3).	225
Figura 7.2. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B y C) y cada uno de los componentes de la microemulsión (D-F) en el modelo de conductividad.	227
Figura 7.3. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B y C) y cada uno de los componentes de la microemulsión (D-F) en el modelo de diámetro medio de Sauter.....	229
Figura 7.4. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B) y los componentes más influyentes de la formulación (C-E) en el modelo de fuerza tensil.....	231
Figura 7.5. Distribución de los residuales estudentizados en función del valor predicho (A), el número de experimento (B) y los componentes más influyentes de la formulación (C-E) en el modelo de tiempo de desintegración.....	233